

# **Respuesta de trigos con el transgén P<sub>SARK</sub>::IPT a restricciones y excesos hídricos**

*Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires, Área  
Ciencias Agropecuarias*

**Daniela Evangelina Becheran**

Ingeniera Agrónoma-Universidad de Buenos Aires - 2015

Cátedra de Cerealicultura-IFEVA  
Departamento de Producción Vegetal  
Facultad de Agronomía  
Universidad de Buenos Aires



**FAUBA**

Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano  
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires



## **COMITÉ CONSEJERO**

Director de tesis

**Daniel Julio Miralles**

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)

Doctor en Ciencias Agropecuarias (Universidad de Buenos Aires)

Co-director

**Leonor Gabriela Abeledo**

Ingeniera Agrónoma (Universidad de Buenos Aires)

Doctora en Ciencias Agropecuarias (Universidad de Buenos Aires)

Consejero de Estudios

**Adrián Ezequiel Bossio**

Licenciado en Biotecnología (Universidad de Quilmes)

Doctor en Ciencias Aplicadas (Universidad de Luján)

## **JURADO DE TESIS**

Director de tesis

**Daniel Julio Miralles**

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)

Doctor en Ciencias Agropecuarias (Universidad de Buenos Aires)

JURADO

**Viviana Echenique**

Licenciada en Ciencias Biológicas (Universidad Nacional del Sur)

Doctora en Biología (Universidad Nacional del Sur)

JURADO

**Cecilia Rousseaux**

Ingeniera Agrónoma (Universidad de Buenos Aires)

Doctora en Ciencias Agropecuarias (Universidad de Buenos Aires)

JURADO

**Paula Fernandez**

Ingeniera Agrónoma (Universidad de Buenos Aires)

Doctora en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Fecha de defensa de la tesis: 12 de Mayo de 2020

**DEDICATORIA**

*A mis padres, Ana y Beto*

*A mis hermanos, Lucas y Facundo*

*A mis tíos, Juan y Mabel*

*A mi compañero y amor, Maxi*

*A mis amigos*

❧

## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mis agradecimientos haciendo uso de la memoria de mi corazón a todos aquellos que de alguna manera fueron parte de este trabajo tesis:

Muy especialmente a Daniel Miralles y a Gabriela Abeledo por confiar en mí. Agradecerles por su extraordinaria predisposición para guiarme en el trabajo de esta tesis, por todo el tiempo que dedicaron, por su enorme paciencia y su aliento. Todos sus aportes han sido de gran riqueza en mi formación tanto profesional como en lo personal.

A Ezequiel Bossio también por brindarme todos sus conocimientos en biología molecular, por recibirme en su grupo de trabajo y hacerme sentir como una más del equipo facilitándome parte de las herramientas necesarias para llevar a cabo la tesis.

A Noelia Grisansich, Silvina Inciso, Maxi Rodriguez, Juani Forcat, Maxi Fabre, Gonzalo Rivelli y especialmente a Juan Fuentes y Guillermo Piparola por su invaluable ayuda técnica y buena predisposición siempre.

A mis queridos compañeros y amigos de oficina con los cuales iniciamos juntos este camino. Agradecerles por estar siempre presentes al pie del cañón tanto en las buenas como en las malas en lo profesional como en lo personal, por los hermosos momentos compartidos: Ginna Roza, Martín Parco, Nico Ciancio, Sebastián Rodríguez y Víctor Giménez.

También a mis demás compañeros y amigos por sus consejos y compartir su experiencia, fueron una hermosa compañía en el día a día: Ale D., Ale S., Coni, Coti, Belén, Beto, Chalo, Diego, Euge, Felipe, Gonza, Guille, José, Luis, Mailen, Nacho A, Nacho H, Pato, Román, Santi A. P., y especialmente a Romi de San Celedonio por haberme brindado los primeros conocimientos en investigación a través de la tesis de grado.

Agradecerles a todos los integrantes de la cátedra de Cerealicultura por el compañerismo y colaboración siempre en todo, también a los integrantes de las cátedras de Producción Vegetal y Cultivos Industriales.

A los integrantes del Instituto de Genética (IGEAF, INTA) por hacerme sentir del equipo, enseñarme las técnicas de laboratorio y darme tanto cariño. Gracias Ailin, Paula, Sarita, Mariana, Laura, Belén, Francisca, Pablo y Dalia.

A la FAUBA por haberme brindado un lugar de trabajo.

Al FONCyT y al CONICET por darme la posibilidad de que realice esta tesis a través de sus becas.

A mi familia que han sido el sostén principal con su amor y apoyo incondicional siempre.

A mi compañero de vida Maxi por su paciencia, amor y acompañarme tanto.

¡Muchas gracias a todos!



*Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en ésta u otra institución.*

Ing. Agr. Daniela E. Becheran

## INDICE GENERAL

INDICE DE FIGURAS.....	xi
INDICE DE CUADROS.....	xix
RESUMEN .....	xxii
ABSTRACT.....	xxiv
CAPÍTULO 1.....	2
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	2
1.1 Planteo del problema y revisión de antecedentes.....	2
1.1.1 Características de la producción de trigo .....	2
1.1.2 Generación del rendimiento .....	5
1.1.2.1 Componentes numéricos del rendimiento .....	5
1.1.2.2 Componentes fisiológicos determinantes del rendimiento.....	7
1.1.3 Estrés hídrico .....	10
1.1.3.1 Efectos negativos del anegamiento y déficit hídrico sobre el cultivo .....	10
1.1.3.2 Senescencia como consecuencia del estrés.....	13
1.1.3.3 Plantas de trigo transformadas con $P_{SARK}::IPT$ como estrategia para mejorar la performance ante estreses abióticos .....	16
1.1.4 Las plantas y la evidencia de los efectos de memoria al estrés.....	22
1.2 Objetivos e hipótesis .....	27
1.3 Estructura de la tesis .....	29
CAPÍTULO 2.....	31
ESTRUCTURA EXPERIMENTAL.....	31
2.1 Descripción general de los experimentos.....	31

2.2	Materiales y métodos .....	32
2.2.1	Material vegetal como factor genotipo .....	32
2.2.1.1	<i>Antecedentes de la obtención y selección de los eventos de trigo transgénicos <math>P_{SARK}:IPT</math></i> 33	
2.2.1.2	<i>Análisis molecular de plantas de trigo transgénicos <math>P_{SARK}:IPT</math></i> .....	35
2.2.2	Condiciones hídricas como factor ambiental .....	37
2.3	Estructura de los experimentos, tratamientos y diseño experimental .....	37
2.3.1	Experimentos en condiciones controladas .....	37
2.3.1.1	<i>Experimentos a nivel planta individual</i> .....	37
2.3.1.2	<i>Experimentos a nivel microcultivo</i> .....	40
2.3.2	Experimentos en condiciones a campo .....	43
2.4	Condiciones meteorológicas .....	45
2.4.1	Experimentos en condiciones controladas .....	45
2.4.1.1	<i>Experimentos a nivel planta individual</i> .....	48
2.4.1.2	<i>Experimentos a nivel microcultivo</i> .....	48
2.4.2	Experimentos en condiciones a campo .....	49
2.5	Mediciones .....	53
CAPÍTULO 3 .....		54
RENDIMIENTO POR PLANTA Y SUS COMPONENTES FISIOLÓGICOS EN TRIGOS TRANSGÉNICOS $P_{SARK}:IPT$ FRENTE A RESTRICCIONES Y EXCESOS HÍDRICOS EN CONDICIONES CONTROLADAS .....		54
3.1	Introducción .....	54
3.2	Materiales y métodos .....	56
3.2.1	Condiciones generales, diseño experimental y tratamientos .....	57
3.2.2	Mediciones realizadas .....	57
3.2.2.1	<i>Fenología y aparición de hojas</i> .....	57

3.2.2.2	<i>Área foliar verde e índice de verdor</i> .....	58
3.2.2.3	<i>Biomasa aérea y radical</i> .....	59
3.2.2.4	<i>Análisis de los datos</i> .....	61
3.3	Resultados .....	65
3.3.1	Fenología y aparición de hojas .....	65
3.3.2	Duración del área foliar verde relativa e índice de verdor relativo .....	66
3.3.3	Biomasa aérea total y radical al momento del inicio y fin del estrés hídrico .....	69
3.3.4	Biomasa aérea y partición a cosecha .....	75
3.3.5	Rendimiento y sus componentes numéricos .....	77
3.3.5.1	<i>Respuesta de las plantas en el número y peso de los granos</i> .....	80
3.3.5.2	<i>Variaciones en los sub-componentes que conforman el número de granos por planta: número de espigas por planta y número de granos por espiga</i> .....	82
3.4	Discusión .....	84
CAPÍTULO 4 .....		93
RENDIMIENTO DE PLANTAS TRANSGÉNICAS P <sub>SARK</sub> ::IPT EN CONDICIONES HÍDRICAS RESTRICTIVAS BAJO CONDICIONES DE CAMPO .....		93
4.1	Introducción .....	93
4.2	Materiales y métodos .....	96
4.2.1	Condiciones generales, diseño experimental y tratamientos .....	96
4.2.2	Mediciones y análisis .....	97
4.2.2.1	<i>Mediciones realizadas</i> .....	97
4.2.2.2	<i>Análisis estadístico de los datos</i> .....	97
4.3	Resultados .....	98
4.3.1	Evaluación de líneas independientes de plantas de trigo P <sub>SARK</sub> ::IPT a campo en condiciones de secano .....	98
4.3.2	Respuesta de los genotipos transgénicos a campo en condiciones hídricas contrastantes	



4.3.2.1	<i>Rendimiento y partición de biomasa</i> .....	100
4.3.2.2	<i>Componentes numéricos del rendimiento</i> .....	106
4.4	Discusión.....	110
4.5	Conclusión .....	117
CAPÍTULO 5.....		118
RESPUESTA AL AMBIENTE MATERNO EN LAS PLANTAS TRANSGÉNICAS P <sub>SARK::</sub> IPT Y EN SUS CONTROLES NO TRANSGÉNICOS .....		118
5.1	Introducción .....	118
5.2	Materiales y métodos .....	121
5.2.1	Condiciones generales, diseño experimental y tratamientos.....	121
5.2.2	Mediciones y análisis .....	122
5.2.2.1	<i>Mediciones realizadas</i> .....	122
5.2.2.2	Análisis estadístico de los datos .....	123
5.3	Resultados .....	123
5.3.1.1	<i>Área foliar al inicio de macollaje y en hoja bandera completamente expandida para distintos estratos foliares</i> .....	123
5.3.1.2	<i>Biomasa aérea, rendimiento y componentes numéricos</i> .....	127
5.3.1.3	<i>Cambios en la biomasa aérea, rendimiento y componentes numéricos respecto a la media general del experimento</i> .....	133
5.4	Discusión.....	139
5.5	Conclusión .....	143
CAPÍTULO 6.....		144
DISCUSION GENERAL.....		144
6.1	Introducción .....	144
6.2	Avances en el conocimiento a partir de la presente tesis .....	147

6.3	Efectos más relevantes del transgén $P_{SARK}::IPT$ en el genoma de trigo .....	152
6.4	Implicancias para investigaciones futuras.....	157
BIBLIOGRAFIA .....		159

## INDICE DE FIGURAS

**Figura 2.1.** Descripción general de los experimentos realizados en los años 2015, 2016, 2017 y 2018 según el nivel de organización, la condición experimental (invernáculo o a campo), y la descripción de la estructura experimental ..... 32

**Figura 2.2.** Análisis molecular por hibridación de sondas (*Southern Blot*). En la calle I se observan dos marcas de hibridación correspondientes al genotipo TR1. En la calle II se observan diez marcas de hibridación correspondientes al genotipo TR4. Para esta determinación se digirió con la enzima XbaI 20 µg de ADN genómico. Luego de resolver la digestión en gel de agarosa 1% y realizar la transferencia a membrana de nylon (Hybond N+) se procedió a la hibridación con una sonda de 354 pb correspondientes al gen *ipt*, marcada con digoxigenin-11-deoxyuridine 5'triphosphosphate (Dig-dUTP). En todos los casos se utilizó como referencia el DNA Molecular Weight Marker III, Digoxigenin labeled (ROCHE). Las flechas indican la localización de las marcas de hibridación reveladas..... 35

**Figura 2.3.** Detección por PCR del transgén *ipt* en una serie de las plantas analizadas. Resultado de amplificación enzimática con los primers forward SARK 2201 que hibrida sobre la zona media del promotor y el primer reverse IPT 2844 el cual hibrida sobre la zona media de la secuencia del gen *ipt*. Calles: 1) a la 12) se identifican plantas positivas para el transgén; 13) Se identifica planta negativa para el transgén; 15) control negativo (ADN de PIF); 16) control positivo (plásmido p BSIPT). El marcador de peso molecular (mwm) utilizado fue 1Kb ladder (Invitrogen). La banda de 643bp correspondiente al transgén *ipt* se

determinó extrapolando con los tamaños de las bandas del marcador de peso molecular 1 Kb ladder.....	36
<b>Figura 2.4.</b> Dinámica del contenido hídrico del suelo en los tubos medido como porcentaje de capacidad de campo en función de los días desde la siembra para los genotipos PIF, TR1 y TR4 en los experimentos 2015 y 2016 (Experimento 2018 sin datos). ....	40
<b>Figura 2.5.</b> Dinámica del porcentaje de humedad del suelo en los contenedores en función de los días desde la siembra. La línea continua representa el tratamiento regado y la línea punteada al déficit hídrico (DH). La barra horizontal indica el periodo en que se impuso el déficit hídrico coincidente con el periodo crítico del cultivo.....	43
<b>Figura 2.6.</b> Condiciones meteorológicas durante el ciclo del cultivo para los años 2015, 2016, 2017 y 2018. Valores diarios (promedio decádico) de temperatura máxima (Tmax), media (Tmed), mínima (Tmin), radiación fotosintéticamente activa incidente (RFA), y déficit de presión de vapor (DPV). ....	47
<b>Figura 2.7.</b> Condiciones meteorológicas durante el ciclo del cultivo en el experimento de Bordenave durante los años 2017 y 2018, y en FAUBA 2018. Valores diarios (promedio decádico) de temperatura media (Tmed) y radiación fotosintéticamente activa diaria incidente (RFA). Las barras representan las precipitaciones (PP) acumuladas cada 10 días. ....	51
<b>Figura 2.8.</b> Diferencia entre las precipitaciones y la evapotranspiración del cultivo (mm) para la localidad de Bordenave y FAUBA en los meses en que estuvo implantado el cultivo. La flecha (↓) determina la ocurrencia de la anthesis. ....	53
<b>Figura 3.1.</b> Esquema del vástago principal detallando la posición de la hoja bandera (HB) y las inmediatamente posteriores a la misma. ....	58

**Figura 3.2.** Esquema teórico del modelo lineal de la relación entre el número de hojas aparecidas en el vástago principal y el tiempo térmico desde la emergencia del cultivo ( $^{\circ}\text{Cd}$ ) para determinar los parámetros de la Ecuación 3.2: a, ordenada al origen y b, tasa de aparición de hojas..... 62

**Figura 3.3.** Peso seco por planta de biomasa aérea (panel superior) y radical (panel inferior) en el estadio de segundo nudo visible (inicio de encañazón) previo al estrés hídrico para los genotipos PIF, TR1 y TR4 en 2015, 2016 y 2018. En el año 2018 no se realizó muestro de biomasa radical. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). Las barras verticales indican los errores estándar. .... 70

**Figura 3.4.** Peso seco de biomasa aérea y radical por planta a los diez días de ocurrida la anthesis para PIF, TR1 y TR4 en los distintos tratamientos (Regado, Anegado y Déficit hídrico) para los experimentos 2015, 2016 y 2018 (no se realizó muestro de biomasa radical en el 2018). Letras diferentes sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). Las barras verticales indican los errores estándar..... 71

**Figura 3.5.** Diferencia entre la biomasa aérea y radical por planta entre los diez días de ocurrida la anthesis (fin del estrés) y el estadio de segundo nudo visible (inicio de encañazón, previo al estrés hídrico) para PIF, TR1 y TR4 en los distintos tratamientos (Regado, Anegado y Déficit hídrico) para los experimentos 2015, 2016 y 2018 (no se realizó muestro de biomasa radical en el 2018). Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Las barras verticales indican los errores estándar..... 73

**Figura 3.6.** Longitud radical por planta en el estadio de segundo nudo visible (previo al estrés hídrico; columnas blancas, Inicio) y a los diez días de ocurrida la anthesis (fin del

estrés hídrico; columnas negras, Final) para PIF, TR1 y TR4 en los distintos tratamientos (Regado, Anegado y Déficit hídrico) para los experimentos 2015y 2016. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Las barras verticales indican los errores estándar..... 75

**Figura 3.7.** Rendimiento en granos por planta ( $\text{g pl}^{-1}$ ) para PIF, TR1 y TR4 en los distintos tratamientos (Regado, Anegado y Déficit hídrico) para los experimentos 2015, 2016 y 2018. Barras llenas indican el rendimiento del vástago principal (VP) y las barras vacías al de macollos (Mac). Letras diferentes sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). Las barras verticales indican los errores estándar..... 79

**Figura 3.8.** Relación entre el rendimiento relativo de granos y peso relativo de mil granos (a) y número relativo de granos por planta (b) para TR1 y TR4 respecto a PIF en la condición hídrica Regado (Reg), Anegado (Aneg) y Déficit hídrico (DH) para todos los años de experimentos (2015, 2016 y 2018) en conjunto..... 80

**Figura 3.9.** Cambios en el número de granos y peso de mil granos por planta para TR1 y TR4 respecto de PIF para la condición hídrica Regado, Anegado y Déficit hídrico para todos los años de experimentos (2015, 2016 y 2018). Las columnas representan los valores absolutos ( $\text{media} \pm \text{error estándar}$ ), los valores sobre cada columna indican el porcentaje respecto a la condición control (PIF) y las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). ..... 81

**Figura 3.10.** Cambio del número de espigas por planta (paneles superiores) y número de granos por espiga (paneles inferiores) para TR1 y TR4 respecto de PIF dentro de la condición hídrica Regado, Anegado y Déficit hídrico para todos los años de experimentos (2015, 2016 y 2018). Las columnas representan los valores absolutos ( $\text{media} \pm \text{error}$

estándar), los valores sobre cada columna indican el porcentaje respecto a la condición control (PIF) y las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). ..... 83

**Figura 4.1.** Rendimiento ( $\text{g m}^{-2}$ ) a campo de dos líneas independientes de plantas  $P_{\text{SARK}}::\text{IPT}$  para los eventos a) TR1, b) TR4, c) PIF, d) segregantes no transgénica (SNT) y e) Box-plot del rendimiento ( $\text{g m}^{-2}$ ) para los genotipos (PIF, SNT, TR1, TR4) En las figuras a, b y d las barras rayadas representan a las líneas que fueron seleccionadas para la próxima generación para los experimentos a campo. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) por el test LSD de Fischer. Las barras verticales indican los errores estándar. Barra llena representa el PIF (c). En la figura e (Box Plot) las líneas horizontales representan la mediana y el punto la media. 99

**Figura 4.2.** Relación del rendimiento ( $\text{g m}^{-2}$ ) con (a) la biomasa aérea total ( $\text{g m}^{-2}$ ) y (b) el índice de cosecha para TR1 (11-TR1, 13-TR1), TR4 (2-TR4, 12-TR4), SNT (34-SNT, 35-SNT) y PIF en la condición hídrica con riego (subíndice “R”) y en seco (subíndice “S”) para los experimentos realizados a campo en Bordenave y en FAUBA en el año 2018. ... 105

**Figura 4.3.** Cambio relativo del rendimiento de cada genotipo respecto del rendimiento promedio general del tratamiento dentro de cada condición hídrica (Regado y Secano) para PIF, 11-TR1, 13-TR1, 2-TR4, 12-TR4, 34-SNT, y 35-SNT. .... 106

**Figura 4.4.** Relación del rendimiento ( $\text{g m}^{-2}$ ) con (a) el número de granos ( $\text{m}^{-2}$ ) y (b) el peso de granos (g) para TR1 (11-TR1, 13-TR1), TR4 (2-TR4, 12-TR4), SNT (34-SNT, 35-SNT) y PIF en la condición hídrica con riego (subíndice “R”) y en seco (subíndice “S”) para los experimentos realizados a campo en Bordenave y en FAUBA en el año 2018. ... 108

**Figura 4.5.** Relación entre el número de granos ( $\text{m}^{-2}$ ) con (a) el número de espigas ( $\text{m}^{-2}$ ) y (b) el número de granos por espiga y relación (c) entre el número de granos por espigas y el número de espigas ( $\text{m}^{-2}$ ) para TR1 (11-TR1, 13-TR1), TR4 (2-TR4, 12-TR4), SNT (34-SNT, 35-SNT) y PIF en la condición hídrica con riego (subíndice “R”) y en secano (subíndice “S”) para los experimentos realizados a campo en Bordenave y en FAUBA en el año 2018..... 110

**Figura 5.1.** Área foliar verde total ( $\text{cm}^2$ ) de la primera hoja (Nro.1) a la cuarta (Nro.4) del vástago principal de plantas correspondientes a la progenie de los genotipos PIF, TR1 y TR4 que se originaron en un ambiente materno con riego (R) y con déficit hídrico (DH) en el período crítico. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) para cada hoja en particular (letras minúsculas) y para el área foliar total (letras mayúsculas)..... 124

**Figura 5.2.** Área foliar verde en el vástago principal de la hoja bandera (HB) al momento de expansión total y las siguientes hojas por debajo de la misma (la HB-1 es la primera por debajo de la HB y así sucesivamente) de plantas correspondientes a la progenie de los genotipos PIF, TR1 y TR4 que se originaron en un ambiente materno con riego (Rm) y con déficit hídrico (DHm) en el período crítico. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) para cada hoja en particular (letras minúsculas) y para el área foliar total (letras mayúsculas) teniendo en cuenta las dos condiciones hídricas (Regado y Déficit hídrico) en cada año..... 126

**Figura 5.3.** Respuesta de la biomasa aérea (a) y del índice de cosecha (b) de la progenie proveniente de ambiente materno con riego y ambiente materno con déficit hídrico cuando estuvieron en una situación con riego (R) y con déficit hídrico (DH) (panel izquierdo) y



separando la respuesta de estos atributos para cada año de experimento 2016 (c, f), 2017 (d, g) y 2018 (e, h). A fin de poder comparar la respuesta de los genotipos con distinto ambiente materno, el valor de cada atributo se relativizó al promedio del correspondiente genotipo en todos los escenarios (i.e. dos condiciones hídricas con dos ambientes maternos contrastantes por condición hídrica). Cada punto (promedio de 3 repeticiones con su correspondiente error estándar) corresponde a PIF (triángulos), TR1 (círculos) y TR4 (cuadrados) con riego (símbolos llenos) o déficit hídrico (símbolos mitad vacíos) durante 2016 y 2017 (símbolos negros) o 2018 (símbolos grises). ..... 135

**Figura 5.4.** Respuesta del rendimiento (a), número de granos (b) y peso de grano promedio de progenies de ambiente materno con riego y ambiente materno con déficit hídrico cuando estuvieron en una situación con riego (R) y con déficit hídrico (DH) (panel izquierdo) y separando la respuesta de estos atributos para cada año de experimento 2016 (d, g, j), 2017 (e, h, k) y 2018 (f, i, l). A fin de poder comparar la respuesta de los genotipos con distinto ambiente materno, el valor de cada atributo se relativizó al promedio del correspondiente genotipo en todos los escenarios (i.e. dos condiciones hídricas con dos ambientes maternos contrastantes por condición hídrica). Cada punto (promedio de 3 repeticiones con su correspondiente error estándar) corresponde a PIF (triángulos), TR1 (círculos) y TR4 (cuadrados) con riego (R, símbolos llenos) o déficit hídrico (DH, símbolos mitad vacíos) durante 2016 y 2017 (símbolos negros) o 2018 (símbolos grises). ..... 137

**Figura 5.5** Respuesta del número de espigas (a), número de granos por espigas (b) de la progenie de ambiente materno con riego y ambiente materno con déficit hídrico cuando estuvieron en una situación con riego (R) y con déficit hídrico (DH) (panel izquierdo) y separando la respuesta de estos atributos para cada año de experimento 2016 (c, f), 2017 (d,

g) y 2018 (e, h). A fin de poder comparar la respuesta de los genotipos con distinto ambiente materno, el valor de cada atributo se relativizó al promedio del correspondiente genotipo en todos los escenarios (i.e. dos condiciones hídricas con dos ambientes maternos contrastantes por condición hídrica). Cada punto (promedio de 3 repeticiones con su correspondiente error estándar) corresponde a PIF (triángulos), TR1 (círculos) y TR4 (cuadrados) con riego (R, símbolos llenos) o déficit hídrico (DH, símbolos mitad vacíos) durante 2016 y 2017 (símbolos negros) o 2018 (símbolos grises). ..... 139

**Figura 6.1.** Esquema simplificado de la respuesta en el rendimiento y componentes numéricos y fisiológicos de los eventos transgénicos respecto al genotipo control a diferente disponibilidad hídrica en condiciones controladas (nivel planta individual), a campo (microcultivo) y distinto ambiente materno (microcultivo). ..... 153

## INDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 3.1.</b> Inicio y fin de los tratamientos de estrés hídrico en días desde emergencia para los tres años de experimento 2015, 2016 y 2018. ....	57
<b>Cuadro 3.2.</b> Números de plantas muestreadas al inicio y fin de la imposición del estrés hídrico y a madurez, para los tres años de experimento 2015, 2016 y 2018 en cada tratamiento de condición hídrica. ....	60
<b>Cuadro 3.3.</b> Tasa de aparición de hojas en el vástago principal (TAH; hojas $\text{pl}^{-1} \text{ } ^\circ\text{Cd}^{-1} \times 1000$ ), filocrono (Fil; $^\circ\text{Cd hoja}^{-1}$ ) y número final de hojas en el vástago principal (NFH; hoja $\text{pl}^{-1}$ ) para las distintas condiciones hídricas y genotipos en los experimentos 2015, 2016 y 2018. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) por el Test LSD de Fischer. ....	66
<b>Cuadro 3.4.</b> Duración del área foliar verde relativa de la hoja bandera (HB) y de las dos hojas por debajo de la misma (HB-1 y HB-2) para las distintas condiciones hídricas y genotipos en los experimentos 2016 y 2018. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) por el Test LSD de Fischer. ....	67
<b>Cuadro 3. 5.</b> Área bajo la curva de SPAD relativo de la hoja bandera (HB) y de las dos hojas por debajo de la misma (HB-1 y HB-2) para las distintas condiciones hídricas y genotipos en los experimentos 2015, 2016 y 2018. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) por el Test LSD de Fischer.) ....	69

**Cuadro 3.6.** Relación biomasa radical: aérea a los 10 días de ocurrida la antesis (fin del estrés) para las distintas condiciones hídricas y genotipos en los experimentos 2015 y 2016. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) por el Test LSD de Fischer. .... 74

**Cuadro 3.7.** Biomasa aérea total ( $\text{g pl}^{-1}$ ) e índice de cosecha para las distintas condiciones hídricas y genotipos en los experimentos 2015, 2016 y 2018 al final del ciclo del cultivo. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) por el Test LSD de Fischer. .... 76

**Cuadro 4.1.** Rendimiento ( $\text{g m}^{-2}$ ), biomasa aérea ( $\text{g m}^{-2}$ ) e índice de cosecha del experimento de FAUBA y Bordenave durante el año 2018 para las distintas condiciones hídricas y genotipos. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) por el Test LSD de Fischer. .... 103

**Cuadro 4.2.** Peso de mil granos ( $\text{P1000}$ , g), número de granos ( $\text{NG m}^{-2}$ ), número de espigas ( $\text{m}^{-2}$ ) y número de granos por espiga ( $\text{NG espigas}^{-1}$ ) del experimento de FAUBA y Bordenave para las distintas condiciones hídricas y genotipos. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) por el Test LSD de Fischer. .... 107

**Cuadro 5.1.** Rendimiento ( $\text{g m}^{-2}$ ), biomasa aérea ( $\text{g m}^{-2}$ ), índice de cosecha (IC), número de granos ( $\text{m}^{-2}$ ), y peso de mil granos (g) para las distintas condiciones hídricas actuales, genotipos y ambiente materno en el experimento 2016. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) por el Test LSD de Fischer. .... 128

**Cuadro 5.2.** Rendimiento ( $\text{g m}^{-2}$ ), biomasa aérea ( $\text{g m}^{-2}$ ), índice de cosecha (IC), número de granos ( $\text{m}^{-2}$ ), y peso de mil granos (g) para las distintas condiciones hídricas, genotipos y ambiente materno en el experimento 2017. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) por el Test LSD de Fischer. .... 130

**Cuadro 5.3.** Rendimiento ( $\text{g m}^{-2}$ ), biomasa aérea ( $\text{g m}^{-2}$ ), índice de cosecha (IC), número de granos ( $\text{m}^{-2}$ ), y peso de mil granos (g) para las distintas condiciones hídricas, genotipos y ambiente materno en el experimento 2018. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) por el Test LSD de Fischer. .... 132

## **Respuesta de trigos con el transgén P<sub>SARK</sub>::IPT a restricciones y excesos hídricos**

### **RESUMEN**

El trigo (*Triticum aestivum* L.) se cultiva en una amplia gama de latitudes y ambientes y, a menudo, se expone a estreses ambientales como déficits y excesos de agua que producen penalización del rendimiento. Una de las posibles estrategias para mejorar la tolerancia a esos estreses es retrasar la senescencia foliar inducida drásticamente por la restricción de agua y el anegamiento. Diferentes evidencias en la literatura muestran que la expresión del gen *ipt*, que codifica para la enzima isopenteniltransferasa (IPT), limitante de la biosíntesis de la citoquinina, bajo el control transcripcional del promotor del gen SARK (Senescence Associated Receptor Kinase), retrasa la senescencia celular y a través de ello podría aumentar la tolerancia al déficit hídrico. El objetivo de esta tesis fue *caracterizar el comportamiento ecofisiológico de trigos transgénicos transformados con el transgén IPT bajo la regulación del promotor SARK*. Para ello se realizaron experimentos en condiciones controladas y a campo. A escala de planta y en condiciones controladas los trigos transgénicos no mostraron penalizaciones en la biomasa total ni en el rendimiento en grano tanto en condición hídrica potencial como en déficit hídrico o anegamiento. A pesar de que los trigos transgénicos demostraron una mayor capacidad para tolerar el estrés hídrico a través del número de granos logrados por planta, las compensaciones observadas entre el número y el peso de los granos no permitieron observar ventajas en el rendimiento. Similares compensaciones se observaron entre el número de espigas por planta y el número de granos por espiga. A nivel de campo, los resultados fueron más promisorios para los eventos transgénicos ya que este tendió a obtener valores de rendimiento por encima ca. 23% del trigo no transgénico en condiciones de secano. La condición del ambiente materno sin restricciones hídricas durante el ciclo ontogénico mostró una mejor performance en su rendimiento cuando la descendencia fue sembrada tanto en condiciones de riego como en condiciones con deficiencias hídricas. En conclusión, los trigos transgénicos no mostraron penalizaciones ante el trigo no transgénico ni en biomasa aérea ni rendimiento en

ninguna de las condiciones exploradas, mostrando algunas ventajas (aunque no siempre consistentes) en el rendimiento de granos a campo en condiciones de secano.

**Palabras clave:** Transformación genética, déficit hídrico, anegamiento, rendimiento, *Triticum aestivum* L.

## **Response of transgenic wheat plants harbouring P<sub>SARK</sub> :: IPT transgene under water stress by hydric restriction and excess**

### **ABSTRACT**

Wheat (*Triticum aestivum* L.) is cultivated in a wide range of latitudes and environments and often exposed to environmental stresses as deficit and water excesses that produce yield penalizations. A possible strategy to improve tolerance to those stresses is to delay foliar senescence that is drastically induced by water restriction and waterlogging. Some evidences demonstrated that the expression of the *ipt* gene, encoding the enzyme isopentenyltransferase (IPT), limiting the biosynthesis of cytokinin, under the transcriptional control of the promoter of the SARK gene (Senescence Associated Receptor Kinase), delays cellular senescence and through it increases tolerance to water deficit in plants. The main objective of the present thesis was to characterize the ecophysiological behavior of transgenic wheats transformed with the IPT transgene under the regulation of the SARK promoter. At the plant-level and under controlled conditions the transgenic wheats did not show significant differences in yield compared to the controls when grown under both potential and water deficit conditions or waterlogging. However, transgenic wheats demonstrated a greater ability to tolerate water stress through an increase in the number of grains per plant than the controls, but the trade-off between the number and weight of grains avoid the detection of yield advantages. Similar trade off was observed between the number of spikes per plant and the number of grains established per spike. However, when transgenic plants were grown under field conditions, previous selection of the transgenic plants with the best performance, and over yield of 23% respect to the non-transgenic wheat was observed under dry conditions. Regarding the epigenetic effects, the descendent plants from maternal environment growth without water restrictions during the ontogenetic cycle showed a better performance than those descendants that came from maternal environment of water restriction when they were grown under irrigation and water deficient conditions. In conclusion, transgenic wheats did not show reductions in grain yield compared with non-transgenic wheat when grown under non-restriction conditions.



However, the advantages of transgenic plant, respect to the controls, were evident (although not always consistent) only under field conditions when plant were exposed to water restrictions.

**Keywords:** Genetic transformation, water stress tolerance, grain yield, *Triticum aestivum* L.



## CAPÍTULO 1

---

### INTRODUCCIÓN GENERAL

#### 1.1 Planteo del problema y revisión de antecedentes

##### 1.1.1 Características de la producción de trigo

La superficie destinada a la producción de los cereales, dentro de ellos el trigo, se está incrementando en el mundo y se estima que su producción mundial para la campaña 2018/2019 fue de 730,4 millones de toneladas (FAO, 2019). Se espera que la demanda de cereales alcance los 3 billones de toneladas en 2050, concentrada en forma mayoritaria en los países en desarrollo, especialmente de Asia y África (Alexandratos y Bruinsma, 2012; Shewry, 2013). Sin embargo, la tasa anual de aumento en la producción de cereales, y junto a ello la tasa de aumento del rendimiento, no son suficientes para satisfacer esta demanda futura (Grassini et al., 2013), dado que dicha demanda crece a tasas mayores que los incrementos en rendimiento en los diferentes países productores de cereales (Reynolds et al., 2009b). A pesar de la creciente demanda en cereales y en particular de trigo, el incremento en el rendimiento de este cultivo en las últimas décadas tendió a estabilizarse e incluso reducirse (Calderini y Slafer, 1998; Miralles y Slafer, 2007; Fischer y Edmeades, 2010), tendencia que también se observó en Argentina tal como lo indica un trabajo reciente de Lo Valvo et al. (2017). Este aumento en la demanda de alimentos se producirá en un escenario de cambio climático global, a raíz del cual se esperan efectos negativos en la producción de cultivos de cereales (Mittler y Blumwald, 2010; IPCC, 2014). Parte de la

ganancia genética que permite aumentar los rendimientos por unidad de área, y por ende la producción, será reducida por los aumentos de temperatura y deficiencias hídricas asociados al cambio climático (Porter et al., 2014; García et al., 2018).

La sequía constituye la mayor restricción para la expansión de los cultivos extensivos en todo el mundo y es uno de los factores ambientales que más efectos negativos produce en el rendimiento (Vinocur et al., 2005). El mejoramiento tradicional ha permitido incrementar los rendimientos en ambientes potenciales (Calderini et al., 1999); sin embargo, bajo condiciones de estrés como por ejemplo restricción hídrica, la variabilidad genotípica obtenida producto del mejoramiento tradicional es sumamente acotada debido a que dicha restricción deprime el rendimiento y la potencial variabilidad entre genotipos. El último informe del Panel Intergubernamental de Cambio Climático (IPCC, 2014) muestra que el clima mundial experimenta un cambio consistente e inevitable, con modificaciones que no sólo se darán en la temperatura (Battisti y Naylor, 2009), esperándose un aumento en la temperatura media, sino también en las condiciones de precipitaciones y particularmente en los ciclos de alternancia de sequía e inundaciones dependiendo de las regiones. A futuro se profundizará la frecuencia de eventos extremos lo que determina un aumento en el riesgo de inundaciones en regiones planas y/o con deficiencias de drenaje (Magrin et al., 2005; Magrin et al., 2007; Fernández Long et al., 2012; Stocker et al., 2013; IPCC, 2014). En Argentina, regiones como el litoral y/o el norte de la provincia de Buenos Aires poseen mayor riesgo de anegamiento que las regiones ubicadas más hacia el oeste (de San Celedonio et al., 2014).

En resumen, es posible afirmar que las condiciones climáticas en las distintas áreas de producción del mundo, así como de Argentina, se rigen por ciclos de sequía e inundaciones

de variabilidad interanual capaces de afectar el rendimiento. El fitomejoramiento, a través de tecnologías multidisciplinarias que utilicen herramientas fisiológicas, moleculares y genéticas, posee la capacidad de proporcionar materiales que puedan hacer frente a condiciones meteorológicas que intensifican situaciones extremas como las inundaciones y las sequías en una misma zona. Sin embargo, parte de las ganancias genéticas obtenidas pueden ser resignadas como producto del cambio climático (Slafer y Andrade, 1991; Lo Valvo et al., 2017). Por ejemplo, estudios recientes muestran que ca. 10% de la ganancia genética en el rendimiento del cultivo de trigo se resigna como consecuencia del cambio climático global (García, 2017). La combinación de información ecofisiológica y molecular podrá permitir gestar un modelo más completo de la relación genotipo: fenotipo y de la interacción genotipo: ambiente (Edmeades et al., 2004). En este marco, las nuevas herramientas de la genómica y fenómica están desempeñando un papel cada vez más importante en la mejora del rendimiento en grano de los cultivares de cereales (Tester y Langridge, 2010). Una de estas herramientas es la identificación de genes vinculados con atributos favorables para aumentar la productividad y la calidad de los cultivos, que favorece su implementación en programas de mejoramiento por el avance de tecnologías en genética y reproducción, y además provee una mejor comprensión de los factores que limitan la explotación práctica del germoplasma complementando el fenotipado de los genotipos. De esta manera será posible seleccionar al genotipo directamente en lugar del fenotipo mediante la selección asistida por marcadores. Los marcadores se han empleado en la selección de progenitores, selección asistida para caracteres cualitativos y cuantitativos, introgresión de genes desde especies silvestres, desarrollo e identificación de organismos genéticamente modificados, entre otros ejemplos.

## 1.1.2 Generación del rendimiento

### 1.1.2.1 Componentes numéricos del rendimiento

El rendimiento de los cultivos de granos es la expresión final de numerosos procesos fisiológicos particulares, que interactúan con el medio ambiente durante el ciclo del cultivo. El rendimiento se genera a lo largo de todo el ciclo ontogénico a causa del aporte que van realizando las distintas estructuras que lo definen (Slafer et al., 2003). Conocer la dinámica del crecimiento del cultivo y cuándo se van determinando los distintos componentes del rendimiento a lo largo del ciclo es de gran importancia dado que restricciones puntuales (e.g. sequías y/o anegamientos) producen importantes efectos negativos en los componentes que definen el rendimiento. El rendimiento puede ser explicado por un modelo sencillo en el que se lo desglosa en sus dos principales componentes numéricos: número de granos por  $m^2$  (NG) y peso final de los mismos:

$$\text{Rendimiento (g m}^{-2}\text{)} = N^{\circ} \text{ granos (\# m}^{-2}\text{)} \times \text{peso de los granos (g)}$$

Si bien ambos componentes son importantes en la determinación del rendimiento, su variabilidad está definida en mayor medida por cambios en el número de granos por unidad de área (NG) más que por variaciones en el peso de estos (Fischer, 1985; Slafer y Andrade, 1993; Slafer et al., 1994; Miralles et al., 1998; Miralles y Slafer, 1999; Borrás et al., 2004; Shearman et al., 2005; Sánchez-García et al., 2013). Aunque el NG se genera a lo largo de todo el ciclo del cultivo, existe una etapa crítica para su determinación ubicada en un lapso que comprende desde los 20 días previos a la antesis hasta los 10 días posteriores a antesis y es denominado periodo crítico (Fischer, 1985; Savin y Slafer, 1991; Slafer y Andrade, 1993; Abbate, et al., 1995). Durante dicha etapa el cultivo presenta la mayor tasa de crecimiento por unidad de área y el mayor consumo diario de agua y nutrientes. En esta

etapa se define el establecimiento de las espigas por unidad área y el número de granos por espiga, componentes ambos que en su conjunto definen al número de granos logrado por unidad de área (Miralles y Slafer, 2007). El número de espigas por superficie depende del macollaje y de la supervivencia de macollos mientras que el número de granos por espiga depende de la supervivencia de primordios florales (Alzueta et al., 2012). Si bien en preantesis se generan hasta diez flores por espiguilla, sólo sobrevive entre el 20-30% de las mismas y entre 70-90% de las flores que alcanzan el estado de flor fértil en antesis llegan a fijar granos (Kirby, 1988; Calderini y Reynolds, 2000; González-Navarro et al., 2015). El peso de las espigas logradas en antesis es un atributo estrechamente relacionado con el número de flores fértiles y de granos por espiga (Fischer, 1985; Fischer, 2011; González et al., 2011). Así, cualquier restricción que ocurra durante el periodo crítico, que reduzca la tasa de crecimiento de las espigas y su peso final, redundará en un menor número de granos por espiga y por lo tanto en un menor rendimiento.

Pese a que el número de granos es la variable que mejor explica el rendimiento, cambios en el peso de los granos pueden afectar el rendimiento una vez establecido el número de granos. Esto se debe a que el peso se define en una etapa acotada del ciclo, determinada por un corto periodo antes de antesis y el momento en que ocurre la madurez fisiológica. En la etapa temprana del desarrollo del grano (inmediatamente previo a la antesis) se define el tamaño de los carpelos que establecen un límite superior, es decir, una restricción física para el desarrollo del grano dado que hay una relación positiva entre el tamaño de los carpelos en antesis y el peso potencial de los granos (Calderini et al., 1999; Ugarte et al., 2007; Hasan et al., 2011; Xie et al., 2015).

El peso del grano puede verse afectado además por la tasa de acumulación de materia seca en el grano y la duración del periodo de llenado. Los cambios en la tasa de llenado de granos son los que explican en mayor medida las variaciones en el peso final alcanzado por los granos (Simmons et al., 1982; Miralles y Slafer, 1999.). Por ejemplo, una baja disponibilidad hídrica afecta negativamente la tasa de llenado de granos, más que la duración del llenado (ya que este último es un proceso vinculado al desarrollo), reduciendo en consecuencia el peso final de los granos (Giunta et al., 1993; Dreccer et al., 2009; Mirbahar et al., 2009). Del mismo modo, anegamientos durante el inicio del periodo de llenado de granos producen una acelerada senescencia del área foliar verde y generan reducciones en el peso final de los granos (de San Celedonio et al., 2014).

#### *1.1.2.2 Componentes fisiológicos determinantes del rendimiento*

Otra forma de analizar la generación del rendimiento es a partir de los componentes fisiológicos que condicionan la generación total de biomasa a madurez y el índice de cosecha (IC):

$$\text{Rendimiento (g m}^{-2}\text{)} = \text{Biomasa (g m}^{-2}\text{)} \times \text{IC}$$

El IC se expresa como una fracción de la producción de biomasa aérea, e indica la asignación de la biomasa total que se deriva a los granos (Donald, 1962; Donald y Hamblin, 1976). El IC ha aumentado de manera significativa a lo largo de los años a través del mejoramiento genético como resultado de la incorporación de los genes de enanismo *Rht* para reducir la altura de planta; ello produjo un incremento en la partición de biomasa hacia las espigas y, en consecuencia, un aumento en la fertilidad de las mismas (Shearman et al., 2005, Reynolds et al., 2009; Sadras y Lawson, 2011; Xiao et al., 2012; Sánchez-García et al., 2013). Las variedades actuales de trigo presentan valores de IC de entre 0,3 a



0,5 (Hay, 1995), cuyo valor superior está cerca del límite teórico de 0,60 calculado por Austin et al. (1980). El IC se ha mantenido estable, sin un avance sistemático, desde principios de los años '90, por lo que el incremento en el rendimiento a futuro deberá ser mayormente explicado por aumentos de la biomasa (Fischer, 2011; Reynolds et al., 2012). Sin embargo, en Argentina un estudio reciente demuestra que la biomasa de los genotipos liberados recientemente en el mercado local no se ha incrementado, mientras que sí lo ha hecho el IC, el cual ha acompañado los aumentos en el rendimiento (Lo Valvo et al., 2017).

La generación de la biomasa es un proceso que depende de la radiación incidente diaria ( $R_{inc}$ ), la eficiencia de intercepción de radiación diaria ( $ei$ ), la eficiencia en el uso de la radiación ( $EUR$ ) y la duración de la estación de crecimiento ( $n$ ) (Slafer et al., 2003; Reynolds et al., 2012):

$$Biomasa (g m^{-2}) = R_{inc} (MJ m^{-2} día^{-1}) \times ei \times EUR (g MJ^{-1}) \times n (días)$$

Uno de los principales objetivos en el manejo de los cultivos es lograr interceptar la mayor proporción de la radiación incidente, ya que la misma es la fuente de energía utilizada para la producción de la materia seca en las plantas (Andrade et al., 1996). Mejorar la eficiencia de captación de recursos, como la energía lumínica, se traduce en una mejora en la producción de biomasa (Hawkesford et al., 2013). La intercepción de la luz se puede optimizar con cambios en la estructura de la planta dados por el aumento en el tamaño del área foliar, su arquitectura y longevidad, lo que lleva a un aumento en la intercepción de la radiación (Reynolds et al., 2005; Reynolds et al., 2009; Zhu et al., 2010; Parry et al., 2011). Estos cambios en la estructura son particularmente relevantes alrededor de anthesis (Fischer y Edmeades, 2010). Esta eficiencia de intercepción de radiación ( $ei$ ) depende del índice de área foliar (IAF) y del coeficiente de extinción lumínica ( $k$ ) que se

asocia a la arquitectura del canopeo (Hipps et al., 1983; Monteith y Unsworth, 1990). Este último es el que define la relación funcional existente entre la eficiencia de interceptación de la radiación y el IAF del cultivo y es dependiente del genotipo y del arreglo espacial. Canopeos erectófilos (menor ángulo de inserción de las hojas con respecto al tallo) presentan un menor valor de  $k$  que aquellos planófilos (Pepper et al., 1977). Por ende, a mayor coeficiente de extinción lumínica, mayor es la proporción de la radiación interceptada por unidad de área foliar.

Por otro lado, la EUR del cultivo está relacionada con la calidad de biomasa producida y depende completamente del proceso de fotosíntesis. Tiene un papel muy importante en la etapa de desarrollo que va entre el periodo de elongación del tallo y la antesis dado que es el periodo donde se establece el número de granos y el tamaño potencial de los mismos (Trapani et al., 1992; Andrade, 1995; Sadras, 2007; Foulkes et al., 2009; Sadras y Denison, 2009; Sadras y Slafer, 2012). Luego de antesis y definido el número de destinos transcurre el llenado de granos hasta madurez fisiológica, utilizándose para el llenado de los granos principalmente la fuente de asimilados provista por la fotosíntesis actual entre floración y madurez fisiológica (aunque en trigo es posible la removilización de asimilados producidos previos a la floración que fueron acumulados en las partes vegetativas como hojas y tallos principalmente). Así, algunas evidencias en la literatura demuestran que la fotosíntesis de la hoja bandera puede aportar hasta un 47% de los asimilados que contribuyen al peso total del grano (Borril et al., 2015), mientras que el resto del carbono para el llenado de los granos proviene de la removilización de las hojas y de las reservas del tallo (Kühbauch y Thome, 1989; Ruuska et al., 2006). Por otro lado, se estima que la espiga aporta entre 10-60% del carbono del grano (Thorne et al., 1965; Maydup et al., 2010).

También se translocan a los granos nutrientes estructurales como el nitrógeno producto de su reciclado desde las hojas durante la senescencia terminal. Este es un proceso que depende del contenido de nitrógeno en las hojas (Evans, 1989; Sinclair y Horie, 1989; Connor et al., 1993), el cual varía con la edad y posición en que se ubican las mismas (Evans, 1983; Trapani et al., 1992; Connor et al., 1993; Dreccer et al., 2000). Como consecuencia de esto, la EUR se ve afectada dado que para que ésta sea alta se debe tener una alta capacidad fotosintética y este proceso está definido por el contenido de nitrógeno foliar (Hikosaka, 2004; Reynolds et al., 2012). Por ello, la removilización de nitrógeno durante el llenado de granos va a impactar en la capacidad fotosintética dado que, para utilizar el nitrógeno disponible en los órganos vegetativos, la planta debe senescer (Dalling, 1985; Uhart, 1998). La removilización de nitrógeno desde las hojas senescentes es importante en los cultivos de cereales como lo es el trigo (Feller y Keist, 1986), dado que determina el contenido de proteínas del grano (Caputo y Barneix, 1997).

El nitrógeno acumulado en el grano proviene principalmente de la removilización de nitrógeno desde hojas y tallos, por lo que la acumulación de materia seca y nitrógeno previo a anthesis determina el stock de nitrógeno disponible durante el llenado de grano. Dicho stock de nitrógeno explica cerca del 50-95% del nitrógeno final en los granos (Martre et al, 2003; Gaju et al., 2014).

### **1.1.3 Estrés hídrico**

#### *1.1.3.1 Efectos negativos del anegamiento y déficit hídrico sobre el cultivo*

Una planta está sometida a estrés cuando se encuentra en condiciones negativas significativamente diferentes de las óptimas para crecer y desarrollar su ciclo productivo. Las diferentes especies o variedades difieren en sus requerimientos óptimos y, por tanto, en

su susceptibilidad a un determinado estrés (Hsiao, 1973; Levitt, 1980). Existen distintas respuestas al estrés, una de las respuestas más inmediatas ante un estrés es una reducción en la tasa de crecimiento de los tejidos (como ocurre por ejemplo ante una deficiencia hídrica debido a una reducción en la tasa de expansión como consecuencia de la falta de ingreso de agua a las células). Otra respuesta es el cierre estomático, donde comienzan a evidenciarse efectos negativos a nivel fisiológico disminuyendo el rendimiento de procesos como fotosíntesis y transpiración. Para compensar esta disminución del rendimiento de los procesos se genera una aclimatación a través de cambios en la actividad o síntesis bioquímica de nuevos componentes como determinadas enzimas. En cierto punto tanto los mecanismos fisiológicos de respuesta y la aclimatación se asemejan, dado a que en ambos se producen cambios en la actividad o síntesis de los componentes bioquímicos asociados con cambios en la tasa de crecimiento y morfología (Lambers et al., 2008).

El trigo en condiciones productivas suele estar sometido a distintas duraciones de estrés hídrico, sequía y/o anegamiento, en algún momento del ciclo ontogénico. Como respuesta se genera una disminución en el contenido hídrico de la planta por ser una especie anisohídrica, de modo que disminuye el volumen celular y la turgencia de la célula por continuar transpirando aún con disminuciones marcadas en el contenido hídrico del suelo (Henson et al., 1989; Tardieu y Simonneau, 1998). Sumado a ello se incrementa la cantidad de solutos y los daños mecánicos sobre células de ciertos tejidos en función de la posición y edad de esta. Esto dependerá del genotipo, de la duración del estrés, de la intensidad del estrés y de la etapa de desarrollo de la planta al momento de ocurrencia del estrés (Schoppach et al., 2016; 2017). Algunas plantas poseen mecanismos de aclimatación que actúan especialmente cuando el estrés (ejemplo déficit hídrico) ocurre lentamente,

disminuyendo la expansión foliar, incrementado la partición a raíces (Potter et al., 2007; Shao et al., 2008) y finalmente ante una continuidad del estrés se produce el cierre de estomas con la consecuente detención de la capacidad fotosintética (Taiz y Zeiger, 2006).

La producción de cultivos agrícolas como el trigo se ha visto reducida en los últimos años por estreses abióticos que redujeron las ganancias genéticas potencialmente alcanzables (Mitler et al., 2010). Los eventos extremos como el exceso y el déficit hídrico generan un efecto sumamente negativo sobre el rendimiento. Los excesos hídricos, que derivan en procesos de anegamiento, tanto a nivel mundial (Shaw et al., 2013) como en Argentina (Viglizzo et al., 2009; de San Celedonio et al., 2014b), reducen los rendimientos debido a un incremento en la mortandad de raíces (como efecto más inmediato) que determina una rápida senescencia foliar y una reducción de la biomasa aérea, debido al cierre estomático e inhibición de la fotosíntesis en forma análoga a lo que sucede con los eventos de sequía. El detenimiento del crecimiento y muerte del sistema radical asociado al anegamiento determina una reducción de la absorción de nutrientes y su translocación (Huang et al., 1995) así como en la disponibilidad de fuente actual de fotoasimilados en el cultivo (pérdida de hojas verdes con capacidad fotosintetizante). La magnitud de las pérdidas de rendimiento pueden ser variables (i.e. 30% al 90%) dependiendo del momento del ciclo ontogénico en que ocurre el anegamiento y de las condiciones ambientales durante dicho estrés (Setter et al., 1999; de San Celedonio et al., 2014a). El período de mayor susceptibilidad del trigo al anegamiento abarca desde inicio de encañazón hasta antesis (de San Celedonio et al., 2014), aunque también se han observado mermas de rendimiento en post-antesis asociadas a un menor tiempo en el llenado de granos debido a una senescencia acelerada de las hojas (Araki et al., 2012). El problema a nivel local es altamente relevante

dado que la etapa previa a antesis es la que posee mayor probabilidad de ocurrencia de anegamiento para la Región Pampeana, dependiendo de las localidades, tal como fue descripto por de San Celedonio et al. (2014b).

Como contrapartida, los estreses asociados a la falta de agua durante el ciclo del cultivo son los más frecuentes tanto a nivel mundial como en Argentina (Vinocur et al., 2005; Kogan, 1997). Al igual que el estrés por excesos hídricos, las reducciones en las precipitaciones durante la fase de encañazón y llenado de grano en trigo producen importantes reducciones en el rendimiento (Hoffman et al., 2008). De forma similar a lo descripto para anegamiento, reducciones hídricas durante el periodo crítico afectan el NG como consecuencia de un incremento en la mortalidad de las flores diferenciadas en las espigas así como de los macollos iniciados que no podrán llegar a establecerse como espigas fértiles al momento de la floración (Mahalakshmi y Bidinger, 1985; Richards, 1991; Wopereis et al., 1996; Winkel et al., 1997; Passioura, 2005).

#### *1.1.3.2 Senescencia como consecuencia del estrés*

El proceso de senescencia en plantas es un mecanismo muy complejo que está regulado por factores tanto genéticos como ambientales. Las hojas se someten a cambios en la estructura celular, en el metabolismo y en la expresión génica durante la senescencia. Por estas características, la senescencia celular no se produce por un mecanismo de decaimiento pasivo, sino que es un proceso regulado activamente que implica la expresión coordinada de genes específicos (Buchanan-Wollaston, 1997; Yoshida, 2003). La senescencia determina una declinación de la actividad fotosintética, una activa degeneración de las estructuras celulares, el reciclado de nutrientes, y finalmente la muerte celular. A pesar de que este proceso ocurre a medida que progresa el tiempo, no necesariamente está asociado

a una instancia de envejecimiento (Smart, 1994; Noodén et al., 1997). Hay evidencias de que la senescencia puede ocurrir en forma independiente de la edad dado que puede ser inducida en tejidos jóvenes y también puede acontecer en forma independiente de la muerte, de manera que puede ser revertida (Bachman, 2002; Thomas et al., 2003).

El mecanismo molecular que controla el último estadio del desarrollo que precede a la muerte celular involucra cambios en los niveles de expresión de numerosos genes. Se han descrito un gran número de genes que activamente participan durante la senescencia, llamados Genes Asociados a la Senescencia (SAGs: del inglés senescence-associated genes), se han identificado de especies como *Arabidopsis*, *Brassica napus* L. y arroz (*Oryza sativa* L.) (Buchanan-Wollaston, 1997; Gan y Amasino, 1997; Quirino et al., 1999; Lee et al., 2001; Yoshida, 2003; Guo et al., 2004; Liu et al., 2008). El estudio de los SAG ha permitido identificar genes que codifican para proteasas, para nucleasas, para enzimas del metabolismo de lípidos y nitrógeno y para otras enzimas involucradas en la removilización de nutrientes (Lim et al., 2007). Por otro lado, los elementos génicos que controlan la expresión de los SAG han sido usados como estrategia para generar una autorregulación del sistema de inhibición de la senescencia.

Diferentes trabajos reportan el uso de construcciones para realizar transgénesis donde se colocó el gen que codifica para la enzima adenosina fosfato isopenteniltransferasa (IPT) aislado de *Agrobacterium tumefaciens* bajo el control transcripcional del promotor específico de senescencia correspondiente al gen SAG12 de *Arabidopsis* (Gan y Amasino, 1995). En las plantas transgénicas que contienen esta construcción se observa la expresión del gen *ipt* en las hojas al inicio de la senescencia y consecuentemente un aumento en el nivel de citoquininas que impide o retrasan la senescencia de las hojas. Estas fitohormonas

tienen la particularidad de regular varios procesos de crecimiento y desarrollo vegetal (Argueso et al., 2010; Perilli et al., 2010) y la función de generar adaptación a distintos estreses (Ha et al., 2012). Por ejemplo, son fundamentales en el proceso de organogénesis en las plantas y en la regulación de diversos procesos fisiológicos como la fotosíntesis, la regulación del crecimiento (dominancia apical), la senescencia, diversas modalidades de muerte celular programada, etc. La enzima codificada por el gen *ipt* tiene como función catalizar el paso limitante en la ruta de biosíntesis de citoquininas (Akiyoshi et al., 1984; Barry et al., 1984). Por ello la expresión heteróloga de este gen provoca un aumento de los niveles endógenos de citoquininas respecto a las plantas control, reduciendo la senescencia foliar y por lo tanto induciendo la tolerancia al estrés hídrico (Howell et al., 2003). En plantas de tabaco en las que se introdujo la expresión del transgén  $P_{SAG12}::IPT$  se observó que la senescencia fue significativamente retrasada en hojas (Ludewig y Sonnewald, 2000). Sin embargo, estas mismas plantas mostraron deficiencia de nutrientes en hojas jóvenes (Jordi et al., 2000), retrasos en la floración (Cowan et al., 2005) y reducción del establecimiento de las plántulas en respuesta al déficit hídrico (McCabe et al., 2001). En el caso de trigos transformados con el transgén  $P_{SAG12}::IPT$  se observó que el periodo de fotosíntesis activa se extendió, al igual que la captación de nitratos por parte de las plantas transformadas, pero los parámetros de rendimiento en grano no se vieron mejorados (Sýkorová et al., 2008). Se especuló que, si el gen *ipt* pudiera expresarse durante estados avanzados del ciclo ontogénico de la planta, pero antes del comienzo de la senescencia, la producción de citoquininas no se limitaría a las hojas viejas y, por lo tanto, la producción de las citoquininas no alteraría la removilización de nutrientes dentro de la planta. Por otro lado, se postuló la posibilidad de que el promotor que regula la expresión del gen *ipt*



pudiera ser inducido en las primeras instancias de la cadena de la señalización del estrés en la planta, lo que permitiría la producción de citoquininas en todos los tejidos que se enfrentan al estrés generado por deficiencia de agua. Para demostrar esto, se utilizó el promotor de otro gen asociado a la senescencia (SAGs) el cual fue aislado de poroto (*Phaseolus vulgaris* L.) denominado Receptor proteína-Kinasa Asociado a la Senescencia (SARK: del inglés senescence-associated receptor-like kinase) (Hajouj et al., 2000; Rivero et al., 2007). Construcciones génicas donde la expresión del gen *ipt* está regulada por el promotor SARK (inducible bajo estrés hídrico) se introdujeron en plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas (Rivero et al., 2007; Rivero et al., 2009; Peleg et al., 2011; Qin et al., 2011; Beznec et al., 2014; Oneto et al., 2016). Este promotor ha sido utilizado con éxito en plantas de tabaco, *Arabidopsis*, algodón, arroz, maíz, maní y trigo disminuyendo los efectos deletéreos sobre la floración y rendimiento, que se registraban como consecuencia de la utilización del promotor SAG12. La expresión regulada por el promotor SARK sólo es inducible en etapas previas de la senescencia, a diferencia del promotor SAG12 que es inducido en estadios más avanzados (Hajouj et al., 2000).

#### *1.1.3.3 Plantas de trigo transformadas con $P_{SARK::IPT}$ como estrategia para mejorar la performance ante estreses abióticos*

En el caso en particular del trigo hay varios trabajos que intentan buscar caminos para contrarrestar los efectos negativos de los estreses abióticos. Entre ellos, reducir la senescencia y preservar por más tiempo el área foliar verde a través de la ingeniería genética. A pesar de la importancia que tiene el trigo dentro de los sistemas de producción, entre los cultivos de gran importancia económica ha sido el último en ser transformado genéticamente (Vasil et al., 1992; Weeks et al., 1993). Esto es debido a un deficiente

sistema de regeneración “*in vitro*” pero que se ha superado con éxito gracias a la combinación de un sistema de regeneración por embriogénesis somática de alta eficiencia y la introgresión de genes mediante el método de biolística. Con esta técnica se han logrado desarrollar trigos transgénicos con la intención de aumentar su tolerancia al estrés hídrico y salino. Se han realizado varias transformaciones en trigo como por ejemplo: (i) el gen codificante de manitol-1-fosfato deshidrogenasa (MTLD), que aumenta la acumulación de manitol, dando una cierta tolerancia al estrés por agua y salinidad (Abebe et al., 2003), (ii) el gen DREB1A de *Arabidopsis thaliana* para conferir tolerancia a la sequía retrasando los síntomas de estrés hídrico (medido en condiciones de invernadero; Pellegrineschi et al., 2004), (iii) el gen TaNAC69 para generar tolerancia a la deshidratación y eficiencia en el uso del agua (Xue et al., 2011), (iv) el gen de cebada HVA1 que codifica proteínas que funcionan como protectores osmóticos y aumentan la resistencia al estrés salino e hídrico (Sivamani et al. 2000), (v) el gen HaHB4 el cual genera la inhibición de la percepción de etileno y no evita el cierre estomático mediado por ABA (González et al., 2019) y (vi) el transgén P<sub>SAG12</sub>::IPT que se ha utilizado en trigo para obtener una mayor tolerancia a la sequía generando un retraso de la senescencia de las hojas (Gan y Amasino, 1995; Veselov et al., 1995; Huynh et al., 2005; Rivero et al., 2007). Todos estos ejemplos de plantas transgénicas han sido analizados al nivel de planta individual adulta y excepcionalmente a una instancia de cultivo experimental (González et al., 2019).

La búsqueda de la obtención de trigos que sean tolerantes al estrés hídrico y/o salino está centrada en mantener el IAF bajo estas condiciones, de modo de conservar el sistema aéreo y radical en funcionamiento y continuar con la absorción de agua y nutrientes. Bajo condiciones de deficiencia hídrica se activa un mecanismo de supervivencia adaptativa

disminuyendo el tamaño de la planta de modo de reducir la pérdida de agua (Buchanan-Wollaston, 1997). Este proceso se genera a través de la regulación de fitohormonas como las citoquininas, el etileno y el ácido abscísico (ABA) (Feller y Fischer, 1994). La reducción en la disponibilidad hídrica, además de reducir la tasa de crecimiento de los órganos vegetativos (i.e. las hojas), induce una disminución en los niveles de citoquininas en el xilema (Smart, 1994; Azcón Bieto y Talón 2000), generándose en paralelo un incremento en la concentración de ácido abscísico (ABA) (Davies y Zhang, 1991). Estos mecanismos hormonales provocan entre otras cosas el cierre estomático (Goicoechea et al., 1997; Naqvi, 1999), disminuyendo la capacidad transpiratoria del cultivo, y acelerando la senescencia foliar. Como consecuencia inmediata de lo mencionado anteriormente, se ve afectada la producción de fotoasimilados en las hojas, principal órgano fotosintético. Esta situación es particularmente relevante durante el periodo crítico de este cultivo. Como fue detallado anteriormente, este lapso comprende el periodo inmediatamente previo a la antesis (ca. 30 días previos) y el inmediatamente posterior a la antesis (ca. 5-7 días post). En este periodo se está generando el número de granos por unidad de área y el peso potencial de los granos que serán establecidos, por lo que mantener el área foliar verde cuando las plantas de trigo crecen bajo condiciones de estrés, como sequía o anegamiento durante el periodo de pre-antesis, es de gran importancia dado que es una etapa donde el rendimiento en grano es más propenso a estar limitado por fuente (Gelang et al., 2000; Joshi et al., 2007; Christopher et al., 2008; Gaju et al., 2011).

Como fue detallado anteriormente, durante el llenado de granos la fotosíntesis actual es la principal fuente de asimilados para llenar los granos, sumado al proceso de translocación de fotoasimilados previamente formados en caso de que la fotosíntesis actual sea

insuficiente. Eventualmente ante una falta de fuente, el cultivo además de utilizar los azúcares de reserva podría promover una compensación de la actividad fotosintética de otros órganos como tallos y espigas (Grashoff y d'Antuono, 1997; Slafer et al., 2003; Carretero et al., 2010, 2011; Serrago et al., 2011). Las evidencias descriptas en relación a la importancia del área foliar como fuente de asimilados ante condiciones de estrés indican que el sostenimiento del área foliar verde durante el periodo crítico, así como durante el llenado de los granos, es de gran relevancia para evitar caídas en el rendimiento, tanto a través de reducciones en el número como en el peso de los granos, ante condiciones desfavorables de estrés que produzcan un aceleramiento de la senescencia (Verma et al., 2004; Christopher et al., 2008; Bogard et al., 2011; Gaju et al., 2011; Derkx et al., 2012). De hecho, pese a que el trigo es un cultivo con acotada limitación por fuente durante el período de llenado de los granos (Borrás et al., 2004), trabajos recientes muestran una asociación lineal y positiva entre el peso del grano y la radiación fotosintéticamente interceptada por el cultivo por grano en post-antesis (Serrago et al., 2013).

Distintas especies tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas han mostrado un retraso de la senescencia ante estrés hídrico cuando expresan el transgén  $P_{SARK}::IPT$ , lo que sugiere que en trigo puede dar resultados positivos. Hay evidencias en plantas de tabaco, de maní, algodón, arroz y maíz que fueron transformadas con el transgén  $P_{SARK}::IPT$  y que han expresado un mantenimiento del rendimiento fotosintético y un retraso en la senescencia de las hojas ante la exposición a condiciones de estrés hídrico (Rivero et al., 2007, 2010; Qin et al., 2011; Peleg et al., 2011; Kuppu et al., 2013; Oneto et al., 2016). En el caso de maní y arroz transformados con el transgén  $P_{SARK}::IPT$  se obtuvo un aumento del rendimiento en granos ante condiciones de estrés hídrico por un mayor número de granos asociado a

cambios en la relación fuente: destino (Qin et al. 2011; Peleg et al., 2011). Se entiende como relación fuente: destino al balance entre el tamaño y funcionalidad de los órganos fotosintetizantes (como proveedores de fuente de fotoasimilados) y los granos (como destinos finales de dichos fotoasimilados).

El Instituto de Genética de INTA ha llevado a cabo transformaciones de plantas de trigo con el transgén  $P_{SARK::IPT}$  (Beznec et al., 2011). Los experimentos conducidos en macetas sobre plantas aisladas mostraron resultados alentadores ya que inicialmente no se detectaron penalizaciones en el rendimiento en las plantas transgénicas sin limitaciones (i.e. condición de riego normal). La exposición de los trigos transformados con el transgén  $P_{SARK::IPT}$  a deficiencias hídricas, en el periodo entre pre-antesis e inmediatamente posterior a la antesis, mostró, en experimentos conducidos en macetas, un sostenimiento del rendimiento en las plantas transformadas respecto de las plantas testigo (Beznec et al., 2014).

En cuanto a la biomasa radical, no hay en trigo  $P_{SARK::IPT}$  evidencias sobre el tema pero sí en otras especies, las que conteniendo el transgén  $P_{SARK::IPT}$  sostuvieron en mayor medida la biomasa radical a nivel de planta individual comparado a plantas controles en condiciones de estrés hídrico (Qin et al., 2011; Kuppu et al., 2013). Plantas de algodón  $P_{SARK::IPT}$  produjeron una mayor biomasa de raíces cuando fueron cultivadas en macetas y comparadas con el testigo ante déficit hídrico (Kuppu et al., 2013). Otro caso fue en plantas de maní con el transgén  $P_{SARK::IPT}$  en condiciones de déficit hídrico, observando también mejoras en la biomasa radical comparadas con las plantas testigo sin transformar (Qin et al., 2011). La respuesta observada en plantas transgénicas de algodón sugiere que la presencia

del transgén podría aumentar la absorción de agua, permitiendo una mayor recuperación luego de una condición de déficit hídrico.

Otros trabajos han evaluado la funcionalidad del gen *ipt* en condiciones de anegamiento a través del ensayo de plantas de *Arabidopsis* transgénicas para el transgén P<sub>SAG12</sub>::IPT. En estos trabajos se observó un sostenimiento de la biomasa aérea por reducción de la senescencia respecto de las plantas control, posiblemente como resultado de una acumulación más rápida de citoquininas en las plantas transgénicas, la cual fue acompañada por adaptaciones fenotípicas, incluyendo la retención de la clorofila y el contenido de hidratos de carbono con respecto a las plantas control (Huynh et al., 2005). En trigo se ha probado modificar la sobreexpresión del gen IPT bajo la regulación del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor en condiciones anegadas (Tereshonok et al., 2011). Los resultados mostraron que las plantas transgénicas anegadas mantuvieron un crecimiento activo mayor comparado a las plantas control en la misma condición. Así, ante condiciones de hipoxia, los controles perdieron el 98% del rendimiento, mientras que las plantas transgénicas redujeron su rendimiento en un 53%, como consecuencia de un mayor sostenimiento de granos por espiga y peso de los granos (Tereshonok et al., 2011). Considerando que las citoquininas retrasan la senescencia, regulan el crecimiento de raíces (Bianco et al., 2013; Miyashima et al., 2013), y modifican el tamaño de los granos (tal las evidencias publicadas en *Arabidopsis*; Riefle et al., 2006; Argyros et al., 2008), aquellos genotipos de trigo modificados con el transgén P<sub>SARK</sub>::IPT podrían tener una respuesta positiva ante condiciones de déficit hídrico y/o de anegamiento. Si bien hay evidencias que demuestran que en condición de planta aislada los trigos genéticamente modificados con la secuencia P<sub>SARK</sub>::IPT presentan ventajas en condiciones de restricción hídrica (Beznec et

al., 2014, 2016), aún no se han explorado (i) las respuestas de trigos modificados bajo déficit hídrico en condiciones de canopeo (i.e. competencia de plantas en condición de cultivo), ni (ii) los mecanismos fisiológicos involucrados en las respuestas asociadas tanto a restricciones como a excesos hídricos. Aspectos como la partición hacia el sistema radical en plantas transformadas con la secuencia  $P_{SARK}::IPT$  ante estreses abióticos tampoco han sido investigados.

#### **1.1.4 Las plantas y la evidencia de los efectos de memoria al estrés**

A partir del estudio de varias especies de plantas se ha comprobado que la respuesta de adaptación a los efectos ambientales tanto por cambios fenotípicos como fisiológicos puede persistir más allá de una sola generación (Alexander y Wulff 1985; Miao et al., 1991; Case et al., 1996; Wulff et al., 1999; Whittle et al., 2009; Kou et al., 2011). De este modo, las plantas presentan la capacidad de adaptarse a ciertos rangos de estrés producidos por los distintos factores abióticos como las altas temperaturas, la sequía, las inundaciones, salinidad, etc., y a factores bióticos, como insectos y patógenos, mejorando en algunos casos la aptitud de respuesta a los estreses mencionados de forma medible (Whittle et al., 2009). Este tema ha sido investigado en los últimos tiempos debido a que estas adaptaciones proporcionan información importante acerca de cómo las poblaciones de plantas naturales pueden sobrevivir en condiciones ambientales extremas (Madlung et al., 2004). Muchas de estas respuestas de las plantas se controlan a nivel molecular por los cambios en la expresión de los genes implicados en las respuestas al estrés (Ingram et al., 1996; Walling, 2000; Kreps et al., 2002; Tardif et al., 2007)

Cuando las plantas están expuestas a condiciones estresantes manifiestan estrategias para minimizar o hacer frente a los efectos del estrés a través de mecanismos de resistencia,

como por ejemplo evitar el estrés en las especies de raíces profundas que crecen en un área de baja precipitación, hasta la tolerancia al estrés en especies mediterráneas que pueden hacer frente a un bajo contenido de agua en hojas (Lambers et al, 2008). Estas estrategias implican una alteración en la homeostasis de la planta durante el crecimiento somático (Shinozaki et al., 2003; Sung y Amasino, 2004), así como modificaciones hereditarias o transgeneracionales de la expresión génica (Whitelaw y Whitelaw, 2006; Boyko et al., 2008). Dichas modificaciones pueden ocurrir sin cambiar la secuencia del ADN original y son conocidos como efectos epigenéticos.

Los efectos epigenéticos se pueden lograr con modificaciones interdependientes como la metilación del ADN, diferentes tipos de modificaciones de las histonas y/ por la remodelación de la cromatina sin alteración de la secuencia de nucleótidos (Wagner et al., 2003; Madlung et al., 2004; Vanyushin et al., 2006). La metilación del ADN es una marca epigenética que promueve el silenciamiento génico a nivel transcripcional (TGS) y juega un importante papel en el mantenimiento de la integridad del genoma mediante el silenciamiento de transposones (Tran et al., 2005). Este proceso por el cual se añaden grupos metilo al ADN es conocido por inhibir la expresión génica mientras que, contrariamente, una reducción en el nivel de metilación conduce a un aumento en la expresión génica (Finnegan et al., 1998). Los estudios acerca del mecanismo de regulación de tipo epigenético en *Arabidopsis*, tuvieron como base las observaciones registradas en maíz a través de los marcadores de pigmentación que afectan el color de los granos. (McClintock, 1984; Reinders y Paszkowski, 2009; Wang et al., 2009). Este análisis epigenómico de líneas de maíz ha ilustrado el impacto de estos mecanismos en grandes genomas y reveló importantes similitudes y diferencias con genomas más pequeños (Li et



al., 2014). Esto llevó al descubrimiento del silenciamiento del transposón, un mecanismo epigenético para minimizar la transposición y la interrupción genómica por elementos transponibles (TEs) lo que contradice la suposición de que los genes permanecen en lugares fijos en los cromosomas. La característica que tienen los transposones, los cuales son fragmentos de ADN, es que cuando cambian de posición y abandonan el lugar en el que estaban, en ese sitio se produce una delección o pérdida de bases. Si el elemento transponible estaba insertado en el interior de un gen, puede que se recupere la función de dicho gen. En el caso del maíz se constató que los transposones se sometieron a ciclos de inactividad, modificaciones asociadas con cambios en la metilación del ADN y no a reordenamientos de la secuencia. Los transposones defectuosos e intactos también pueden ser modificados epigenéticamente luego de la exposición a un transposón activo (Federof, 1989).

Se ha revelado que la reactivación de elementos transponibles en ciertas células de gametofito y la semilla refuerza el silenciamiento de estos elementos en la línea germinal y el embrión (Slotkin et al., 2009; Mosher y Melnyk, 2010). Estos cambios epigenéticos adquiridos por las células somáticas antes del surgimiento del linaje celular reproductivo pueden transferirse potencialmente a la siguiente generación a través de la línea germinal (Molinier et al., 2006). Varios trabajos sugieren que los estreses tanto abióticos como bióticos son fuente del silenciamiento génico a nivel transcripcional promovida por la metilación del ADN, llevando a cabo la herencia de características somáticas inducidas (Jablonka y Raz, 2009; Pecinka et al., 2009; Boyko et al., 2010; Kathiria et al., 2010; Lang-Mladek et al., 2010; Verhoeven et al., 2010; Eichten et al., 2011; Hauser et al., 2011; Paszkowski y Grossniklaus, 2011; Becker y Weigel, 2012; Holeski et al., 2012; Jablonka, 2012b; Luna et al., 2012; Luna y Ton, 2012; Rasmann et al., 2012; Ou et al., 2012). En el

caso del ADN de trigo las secuencias derivadas de elementos transponibles son abundantes (Echenique et al., 2002) y se ha observado la activación de los elementos transponibles en condiciones de estrés biótico y abiótico (Hirochika, 1995; Wendel y Wessler, 2000). La expresión de estos elementos transponibles se silencia tanto en la transcripción y después de la misma a través de mecanismos epigenéticos (Slotkin y Martienssen, 2007), pudiendo afectar genes vecinos debido a su alta tasa de inserción y delección lo cual genera un rápido cambio de las regiones intergénicas (Dubcovsky y Dvorak, 2007). En trigo se observaron cambios en la metilación del ADN inducido por el estrés salino en ensayos donde se incluyó un cultivar tolerante y otro susceptible. En el cultivar tolerante hubo mayor desmetilación a pesar de que el cultivar susceptible tenía un nivel de metilación más bajo en condiciones controladas. De este modo, se considera que los cambios en la metilación del ADN puede ser un efecto indirecto del estrés salino o un mecanismo defensivo preciso para regular la expresión génica (Zhong et al., 2009). En cultivos como arroz también se detectaron cambios en la metilación del ADN bajo estrés salino (Wang et al., 2011), así como también por estrés inducido por deficiencia de nitrógeno, lo que generó una alteración heredable en la metilación del ADN produciendo un aumento de la tolerancia a las deficiencias de nitrógeno de la progenie (Kou et al., 2011). Otro ejemplo de adaptación con respuesta a la herencia epigenética en arroz es el vinculado a ciertos loci desmetilados, analizado durante nueve generaciones en este cultivo (Akimoto et al., 2007). Uno de estos loci desmetilados contenía el gen Xa21G que se reprime de manera estable y confiere resistencia al patógeno *Xanthomonas oryzae* (Akimoto et al., 2007).

Otras evidencias de herencia epigenética están vinculadas a la vernalización, característica de algunos trigos invernales, donde el tratamiento de baja temperatura reduce

el nivel de metilación del ADN, en analogía con lo que se vio en *Arabidopsis thaliana* y achicoria (*Cichorium intybus* L.) (Brock y Davidson, 1994; Demeulemeester et al., 1999; Sherman y Talbert, 2002). Ensayos comparativos entre trigos invernales y trigos primaverales mostraron que el trigo invernal estaba más altamente metilado que el trigo primaveral, sugiriendo que no sólo hay una desmetilación inducida por la vernalización relacionada con la inducción floral, sino que también existe una desmetilación más general ocasionada por el tratamiento de baja temperatura. Se sabe que en paralelo a la reducción en la metilación del ADN hay un aumento en la actividad de la expresión génica (Finnegan et al., 1998).

Otro caso de herencia transgeneracional ha sido reportado en *Polygonum persicaria* donde se observó que el ambiente en que crecieron las dos generaciones anteriores puede influir en el fenotipo de la progenie. Cuando las dos generaciones sucesivas se expusieron a estrés por sequía se indujo en su descendencia un mayor crecimiento de raíces y supervivencia bajo condiciones de restricción hídrica. En algunos atributos como la producción de semillas, los efectos del estrés fueron notables, sosteniendo y/o aumentando la producción de semillas cuando las dos generaciones anteriores estuvieron expuestas a deficiencias hídricas comparado con las que provenían de generaciones que no estuvieron expuestas a dicho estrés (Herman et. al., 2012).

Muchos estudios sugieren que la metilación del ADN influye en la señalización de las hormonas en las plantas ya que se ha observado una relación estrecha entre la regulación epigenética y la señalización de distintas hormonas (Zhu, 2010; Salehin et al., 2015; Yamamuro et al., 2016). En este sentido, algunos trabajos relacionan a las citoquininas con la regulación epigenética, en plantas de azalea, donde tanto las citoquininas como la

isopenteniladenina, y la dihidrozeatina y su ribósido, se asocian con el final de la latencia y el inicio de la floración por metilación del ADN. Estas evidencias sugieren que las citoquininas son un factor epigenético que podría controlar la expresión génica durante la transición floral, proponiendo que dichas hormonas inducen la desmetilación (Meijon et al., 2011). Otro ejemplo es el de mutantes de *Arabidopsis* donde la floración tardía podría estar relacionada con una reducción en la metilación del ADN que afecta a los genes de señalización de citoquininas (Li et al., 2008). En manzano, por ejemplo, se observó también un efecto de la metilación en la expresión del gen IPT5b que determina la biosíntesis de citoquininas. Un alto nivel de metilaciones en la región promotora del gen IPT5b disminuye su expresión, lo que conduce a una baja biosíntesis de citoquininas (Feng, et al, 2017). Teniendo en cuenta las evidencias descritas anteriormente, la sobreexpresión de las citoquininas en las plantas que portan el transgén P<sub>SARK</sub>::IPT, (Howel et al., 2003) podría determinar que tengan comportamientos diferenciales en cuanto a la respuesta epigenética respecto de las plantas control. Es decir, que el condicionamiento asociado al ambiente materno durante el desarrollo y crecimiento de los granos podría ser total o parcialmente compensado por la sobreexpresión de las citoquininas, respecto de las plantas control, cuando estas crecen en un ambiente asociado con estrés.

## **1.2 Objetivos e hipótesis**

El objetivo general de la tesis fue caracterizar el comportamiento ecofisiológico de trigos transgénicos transformados con la secuencia del transgén IPT bajo la regulación del promotor SARK.

Los objetivos particulares fueron:

I. Caracterizar el rendimiento y sus atributos fisiológicos (biomasa, índice de cosecha, peso y número de granos, etc.) en plantas de trigo transformadas con el transgén  $P_{SARK::IPT}$  y compararlas con plantas control frente a restricciones y excesos hídricos durante el periodo crítico del cultivo.

II. Analizar la partición entre la biomasa aérea y radical en plantas transformadas con el transgén  $P_{SARK::IPT}$  (y su comparación con los controles) en respuesta a restricciones y exceso hídricos en el periodo crítico.

III. Evaluar si las plantas que portan el transgén  $P_{SARK::IPT}$  y las plantas control no transgénicas presentan alguna herencia transgeneracional de adaptación ambiental.

Las hipótesis de trabajo planteadas fueron:

I. En condiciones potenciales (sin restricciones hídricas ni nutricionales) los genotipos de trigo que expresan el transgén  $P_{SARK::IPT}$  no penalizan en la producción de biomasa ni en el rendimiento alcanzado cuando son comparados con el control no transgénico.

II. Genotipos de trigo que expresan el transgén  $P_{SARK::IPT}$  expuestos a estreses abióticos (i.e. restricciones y excesos hídricos) en su comparación con la condición sin estrés penalizan en menor medida el rendimiento respecto del control no transgénico debido a un retraso en la senescencia foliar, permitiendo una mayor producción de biomasa y por ende un mayor rendimiento.

III. Restricciones y excesos hídricos reducen el rendimiento en menor magnitud en las plantas de trigo que expresan el transgén  $P_{SARK::IPT}$ , respecto de las plantas control, debido a una menor reducción en el número de granos por planta y por unidad de área. No se esperan cambios en el peso de los granos.

IV. Las plantas de trigo que expresan el transgén  $P_{SARK}::IPT$  presentan una mayor partición a raíces tanto en términos absolutos como relativos respecto de las plantas control cuando son expuestas a condiciones hídricas estresantes.

V. Plantas de trigo que expresan el transgén  $P_{SARK}::IPT$  presentan durante y después del periodo de imposición del estrés mayor contenido de nitrógeno foliar (cuantificado mediante el verdor SPAD) en comparación con plantas control.

VI. Las plantas de trigo que expresan el transgén  $P_{SARK}::IPT$  presentan herencia transgeneracional de adaptación ambiental, lo que le da una performance distinta dependiendo del estímulo ambiental en las que se originó las semillas.

### **1.3 Estructura de la tesis**

La tesis se encuentra estructurada en 6 capítulos. Con un primer capítulo introductorio, un segundo capítulo de estructura general de los experimentos, seguido de tres capítulos donde se presentan y discuten los resultados, y un capítulo final de discusión general.

- Capítulo 1: El presente capítulo incluye una introducción general con los antecedentes que dan origen al planteo de la problemática, tal como se detalló en su contenido (ver arriba), e incluye los objetivos e hipótesis a ser abordados en la tesis.
- Capítulo 2: Descripción de la estructura general de cómo fueron ejecutados los experimentos que se llevaron a cabo para responder a los objetivos planteados.

- Capítulo 3: Resultados de rendimiento y sus componentes fisiológicos de plantas transgénicas  $P_{SARK::IPT}$  a restricciones y excesos hídricos en condiciones controladas.
- Capítulo 4: Resultados de rendimiento y sus componentes numéricos de plantas transgénicas  $P_{SARK::IPT}$  a restricciones y excesos hídricos en condiciones a campo.
- Capítulo 5: Resultados de la determinación de herencia transgeneracional de adaptación ambiental por parte de las plantas transgénicas  $P_{SARK::IPT}$  y las plantas control no transgénicas.
- Capítulo 6: Discusión general de los resultados más relevantes de cada uno de los capítulos de resultados.

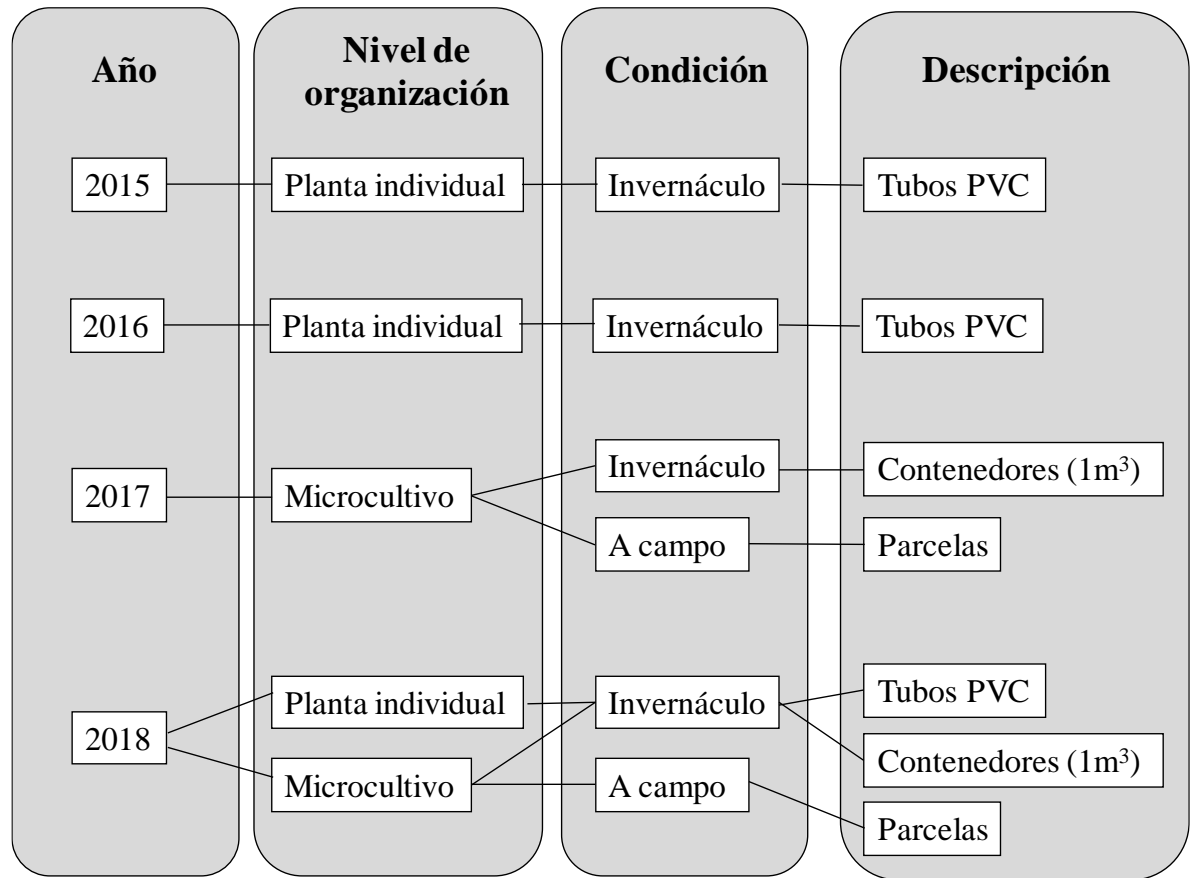
## **ESTRUCTURA EXPERIMENTAL**

### **2.1 Descripción general de los experimentos**

Para la obtención de los resultados de la presente tesis se llevaron a cabo experimentos con trigo transgénico  $P_{SARK::IPT}$  bajo condiciones controladas generadas en un invernáculo de bioseguridad y en condiciones de campo. En todos los casos, al ser semilla de trigo regulada, se cumplió con el marco normativo que propone el Instituto Nacional de Semillas (INASE) para la manipulación de organismos genéticamente modificados (OGM).

En la presente tesis se utilizaron dos tipos de escala de análisis: una a nivel de planta individual (sólo en la primera condición) y otra de microcultivo, para abordar cada uno de los objetivos planteados en el Capítulo 1 y poner a prueba las hipótesis que los sustentan. Los experimentos llevados a cabo en los años 2015, 2016 y 2018 se realizaron a nivel de planta individual en condiciones controladas, mientras que aquellos experimentos conducidos durante los años 2017 y 2018 se condujeron en condiciones controladas, semicontroladas y a campo (Figura 2.1).





**Figura 2.1.** Descripción general de los experimentos realizados en los años 2015, 2016, 2017 y 2018 según el nivel de organización, la condición experimental (invernáculo o a campo), y la descripción de la estructura experimental

En todos los experimentos se realizaron tratamientos donde se combinaron los factores genotipo y ambientales.

## 2.2 Materiales y métodos

### 2.2.1 Material vegetal como factor genotipo

Se utilizaron semillas de trigo (*Triticum aestivum* L.) del cultivar ProINTA Federal (*wild type*, PIF) como plantas control y semillas de dos líneas independientes de la misma variedad con el transgén P<sub>SARK</sub>::IPT (dos eventos transgénicos denominados TR1 y TR4).

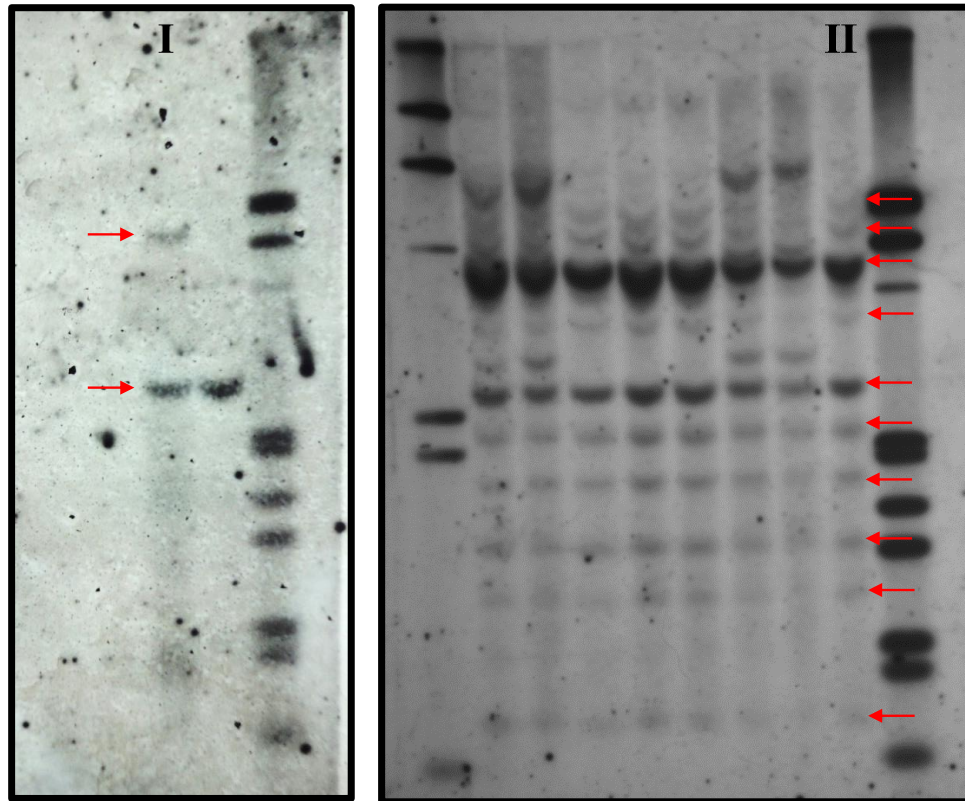
### 2.2.1.1 Antecedentes de la obtención y selección de los eventos de trigo transgénicos *P<sub>SARK</sub>::IPT*

El proceso de obtención y selección de las plantas transgénicas de trigo *P<sub>SARK</sub>::IPT* fue realizado en un trabajo previo por Beznec (2016), el cual se detalla brevemente a continuación.

Se generaron con la introducción del transgén *P<sub>SARK</sub>::ipt::tnos* en la variedad ProINTA Federal (PIF) mediante el método biolístico en el Instituto de Genética “Ewald A. Favret” (IGEAF), unidad funcional del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (Beznec et al, 2011). Se partió de semillas inmaduras de plantas de trigo ProINTA Federal que estaban en un estado fenológico de 20 días post-antesis cultivadas en cámara de crecimiento controlado. Se extrajeron los embriones inmaduros y se disectaron escutelos de 1mm de largo. Una vez logrado el bombardeo de los escutelos, se obtuvieron los explantes que se regeneraron *in vitro* mediante embriogénesis somática para la obtención de plantas completas. Como resultado se obtuvieron seis eventos transgénicos independientes (TR1, TR2, TR3, TR4, TR5 y TR6) que contaban con la Unidad Transcripcional (UT) de forma estable en base a los análisis moleculares pertinentes. Estas plantas transgénicas (*T<sub>0</sub>*) presentaron características morfológicas similares a las plantas de trigo ProINTA Federal (*wild type*). En base a ellas se generaron varias progenies (*T<sub>1</sub>*, *T<sub>2</sub>*, *T<sub>3</sub>*, *T<sub>4</sub>*) de cada evento obtenido donde en estado de plántula se comprobó por PCR la presencia del transgén *ipt*. Aquellas que presentaron PCR positivas (lo que confirma la presencia del transgén) en cada progenie se trasplantaron individualmente a macetas plásticas de 1,2 l en un cuarto de cultivo donde a una serie de plantas de cada evento transgénico, junto con las de *wild type*, se las expuso a condiciones potenciales de nutrientes y disponibilidad hídrica y otras fueron

sometidas a una restricción hídrica entre macollaje (Z2.1, Zadoks et al., 1974) y floración (Z6.5, Zadoks et al. 1974). Se evaluaron las características genotípicas y fenotípicas de todas las plantas durante cada progenie y se identificaron aquellas que bajo déficit hídrico manifestaron presencia del transcripto del gen *ipt* y similar aspecto a sus pares bajo condiciones óptimas de riego. En función de ello, se seleccionaron dos de los seis eventos que presentaban una mejor performance (rendimiento por planta) que el *wild type*. Los seleccionados fueron eventos transgénicos TR1 y TR4 para trabajar en futuros experimentos en macetas, microcultivos y a campo. En el inicio de esta tesis se utilizaron semillas de los eventos TR1 y TR4 pertenecientes a la generación T5 y T6.

El número de de sitios de inserción en los eventos TR1 y TR4 para las generación T6 se analizo a través de *Southern blot*. Las autoradiografías (Figura 2.2) indicaron un número de 2 copias en el evento TR1 y de 10 copias en el evento TR4 del gen *ipt* integrado en el genoma de las plantas transgénicas.

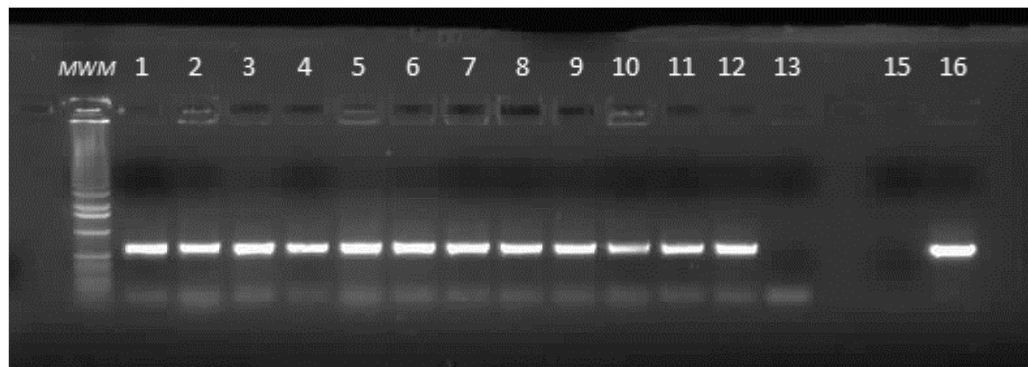


**Figura 2.2.** Análisis molecular por hibridación de sondas (*Southern Blot*). En la calle I se observan dos marcas de hibridación correspondientes al genotipo TR1. En la calle II se observan diez marcas de hibridación correspondientes al genotipo TR4. Para esta determinación se digirió con la enzima XbaI 20 µg de ADN genómico. Luego de resolver la digestión en gel de agarosa 1% y realizar la transferencia a membrana de nylon (Hybond N+) se procedió a la hibridación con una sonda de 354 pb correspondientes al gen *ipt*, marcada con digoxigenin-11-deoxyuridine 5'triphosphosphate (Dig-dUTP). En todos los casos se utilizó como referencia el DNA Molecular Weight Marker III, Digoxigenin labeled (ROCHE). Las flechas indican la localización de las marcas de hibridación reveladas.

#### 2.2.1.2 Análisis molecular de plantas de trigo transgénicos $P_{SARK}::IPT$ desarrollados durante la tesis

Las plantas transgénicas  $P_{SARK}::IPT$  de los experimentos desarrollados en condiciones controladas en la presente tesis fueron analizadas molecularmente para constatar la presencia y expresión del transgén utilizando las siguientes técnicas de biología molecular.

Extracción de ADN y análisis de PCR: Esta evaluación molecular se realizó en estado de plántula (Z1.2, Zadoks et al., 1974) en la cual se tomó una porción (0,5 cm) de la segunda hoja para la extracción de ADN genómico del tejido foliar (Dellaporta et al., 1983). Una vez extraído el ADN, éste se analizó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la presencia o ausencia del gen IPT. La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl con 20-50 ng de ADN genómico de trigo como molde (Figura 2.3).



**Figura 2.3.** Detección por PCR del transgén *ipt* en una serie de las plantas analizadas. Resultado de amplificación enzimática con los primers forward SARK 2201 que hibrida sobre la zona media del promotor y el primer reverse IPT 2844 el cual hibrida sobre la zona media de la secuencia del gen *ipt*. Calles: 1) a la 12) se identifican plantas positivas para el transgén; 13) Se identifica planta negativa para el transgén; 15) control negativo (ADN de PIF); 16) control positivo (plásmido p BSIPT). El marcador de peso molecular (mwm) utilizado fue 1Kb ladder (Invitrogen). La banda de 643bp correspondiente al transgén *ipt* se determinó extrapolando con los tamaños de las bandas del marcador de peso molecular 1 Kb ladder.

Análisis de expresión del transgén: Para la PCR en tiempo real (RT-PCR y RT-qPCR), se detectó la expresión del gen *ipt* al finalizar el tratamiento de estrés hídrico, aspecto que se detalla en el siguiente ítem, para ello se extrajo el ARN total del tejido foliar de cada planta con Trizol (Invitrogen, EE. UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante, y se cuantificó con un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, EE. UU.). Los ARN totales se trataron con ADNasa libre de RN1 RNasa (Promega, EE. UU.) para eliminar el ADN contaminante. La ausencia de ADN en muestras de ARN se confirmó

por análisis de PCR. El ADNc de la primera cadena se sintetizó con oligo (dT) 18 como cebador y transcriptasa inversa SuperScript III (Invitrogen, EE. UU.) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se utilizó un sistema de detección en tiempo real Iqycler IQ (BioRad, EE. UU.). El gen TaCCF de trigo, que codifica un factor de condensación cromosómico putativo, se usó como un gen de control interno (Stephenson et al., 2007). Los transcritos del gen *ipt* se amplificaron usando el kit IQ SuperMix PCR (BioRad, EE. UU.) con los cebadores: iptF70 e iptR70. Las condiciones de ciclado de PCR comprendieron un ciclo a 95 ° C durante 5 min, seguido de 45 ciclos a 95 ° C durante 20 s y a 60 ° C durante 40 s.

## **2.2.2 Condiciones hídricas como factor ambiental**

Experimentos en condiciones controladas: Los tratamientos de estrés hídrico realizados en condiciones controladas consistieron en: (i) cultivos con riego normal, sin restricciones hídricas (Regado); (ii) cultivo anegado durante el periodo crítico (i.e. 25-30 días previos a antesis hasta 10 días post antesis) (Anegado); y (iii) cultivo con restricción hídrica durante el mismo periodo que el tratamiento (ii) (Déficit hídrico).

Experimentos en condiciones a campo: En los experimentos en condiciones de campo, los tratamientos fueron (i) control con riego sin restricciones hídricas y (ii) sequía aplicada durante el periodo crítico del cultivo.

## **2.3 Estructura de los experimentos, tratamientos y diseño experimental**

### **2.3.1 Experimentos en condiciones controladas**

#### *2.3.1.1 Experimentos a nivel planta individual*

Durante tres años (2015, 2016 y 2018) se realizaron distintos experimentos dentro de un invernáculo de bioseguridad del Instituto de Genética “Ewald A. Favret” (IGEAF) unidad

funcional del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Buenos Aires, Argentina (34° 35' S, 58° 29' N). Los tratamientos consistieron en combinaciones de genotipos y tratamientos de déficit y exceso hídricos. Las semillas provenientes del cultivar ProINTA Federal (PIF) de las plantas transgénicas P<sub>SARK::IPT</sub> (TR1 y TR4) fueron sembradas en *speedlings* en fecha óptima para el cultivar PIF (20 de mayo para los tres años) hasta que las plántulas expandieron la segunda hoja (Z1.2, Zadoks et al. 1974), y luego fueron transplantadas en tubos para completar su ciclo ontogénico hasta madurez de cosecha. Los tubos utilizados eran de policloruro de vinilo (PVC) de 75 cm de largo y 6 cm de diámetro, rellenos con una mezcla 2:1 de arena y tierra, y cubiertos en su parte inferior por un tejido de malla fina que actuó como contención. Los tubos estuvieron insertos sobre una estructura metálica de contención dentro de contenedores plásticos de 1 m<sup>3</sup> (1 m x 1 m x 1 m) siguiendo la disposición de una estructura de cultivo. Se utilizaron contenedores plásticos donde cada uno de ellos correspondió a un tratamiento hídrico. En total se utilizaron 162 tubos distribuidos aleatoriamente dentro de los contenedores correspondiendo 56 tubos para cada genotipo (PIF, TR1 y TR4). El diseño experimental fue en parcelas divididas, asignándose la parcela principal a la condición hídrica y la subparcela al genotipo (dentro de cada tratamiento de estrés hídrico los genotipos se distribuyeron al azar).

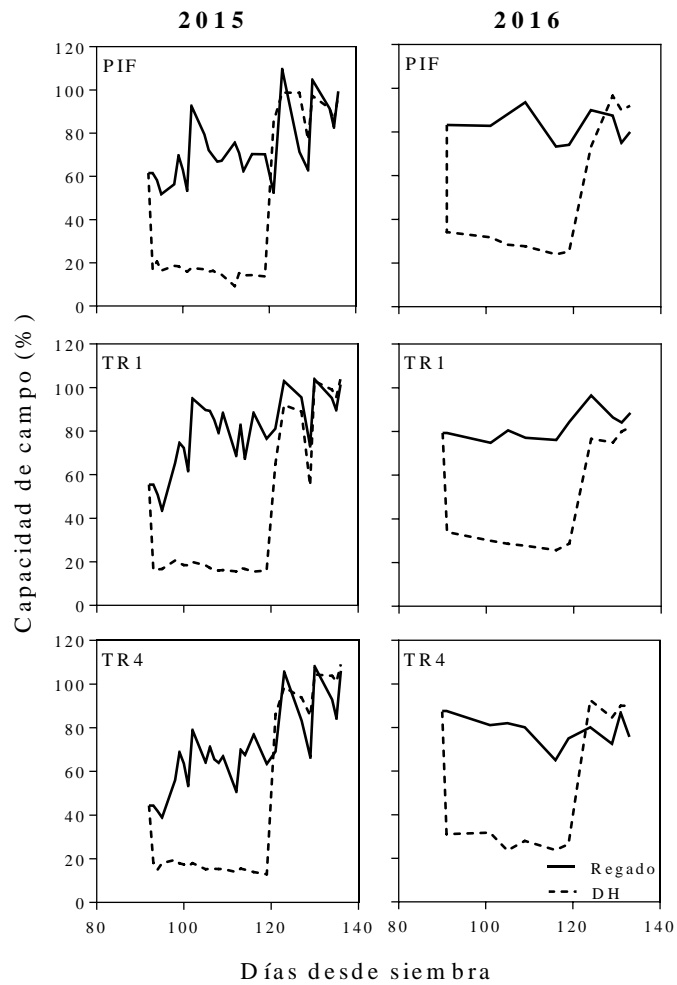
El tratamiento de exceso hídrico (Anegado) se implementó mediante el llenado del contenedor que contiene a los tubos con agua, hasta 2 cm por encima de la parte superior de los tubos y se evitó el drenaje cerrando la válvula de desagote de la parte inferior del contenedor. Una vez finalizado el tratamiento se abrió la válvula inferior del contenedor y se mantuvo en capacidad de campo hasta madurez fisiológica. Debido a la composición de

la mezcla arena y tierra (2:1) el drenaje de los tubos fue inmediato de modo que al cabo de unos minutos de abrirse la válvula de desagote el cultivo fue liberado del anegamiento. Durante todo el periodo previo al anegamiento los contenedores se mantuvieron a capacidad de campo.

En el tratamiento de restricción hídrica, llamado “Déficit hídrico”, los tubos se mantuvieron con un 80% de capacidad de campo hasta el inicio de este (inicio del periodo crítico), momento en el cual se dejó de regar hasta lograr un 20% de capacidad de campo y se mantuvo durante todo el periodo de restricción hídrica. Finalizado el tratamiento se regó para mantener los tubos nuevamente el 80% de capacidad de campo hasta madurez fisiológica. El tratamiento control (Regado) se mantuvo el 80% de capacidad de campo durante todo el ciclo del cultivo (Figura 2.4).

Las mediciones del contenido de humedad fueron realizadas con una sonda hídrica (MPM 160 Moisture Probe Meter, ICT International Pty Ltd, Australia) la cual emite las mediciones en milivoltios (mV). Donde los datos fueron transformados como porcentaje de la capacidad de campo del suelo a través de un modelo que relaciona porcentaje de capacidad de campo con el potencial hídrico (mV) descrito y ajustado previamente por Beznec, et al 2016 para el mismo sustrato.





**Figura 2.4.** Dinámica del contenido hídrico del suelo en los tubos medido como porcentaje de capacidad de campo en función de los días desde la siembra para los genotipos PIF, TR1 y TR4 en los experimentos 2015 y 2016 (Experimento 2018 sin datos).

En todos los casos los ensayos se mantuvieron con alta disponibilidad de nutrientes a través de fertilizaciones y se controlaron las adversidades bióticas. Además, el experimento se condujo con control de adversidades bióticas desde siembra hasta madurez.

#### 2.3.1.2 Experimentos a nivel microcultivo

Para poder llevar a cabo este experimento, que tenía como objetivo evaluar la herencia transgeneracional (efecto materno) del transgén  $P_{SARK}::IPT$  se realizaron tres experimentos

a escala de microcultivo (ver descripción debajo) durante el 2016, 2017 y 2018 dentro del mismo invernáculo mencionado en el punto anterior.

En el año 2016 se realizó el experimento sólo con el genotipo ProINTA Federal el cual es el fondo genético de los transgénicos  $P_{SARK::IPT}$ , tal como se explicó en el ítem 2.2.1 del presente capítulo. El objetivo de este experimento fue detectar si este genotipo manifestaba alguna evidencia de variabilidad fenotípica ante un déficit hídrico, dependiendo de si el ambiente materno donde fueron generadas las semillas tuvo o no un déficit hídrico en el periodo crítico del cultivo para la generación del rendimiento. En base a los resultados obtenidos en este experimento (resultados descriptos en el Capítulo 5) se realizaron dos experimentos más, uno en el año 2017 y otro en el año 2018 en los cuales se incorporaron los genotipos transgénicos  $P_{SARK::IPT}$ .

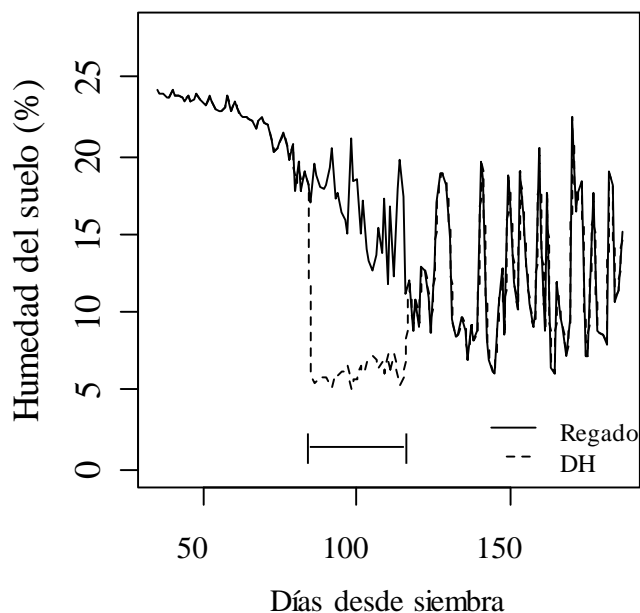
Los tres experimentos tuvieron la misma estructura y diseño experimental tal como se describe a continuación con la diferencia que en el 2016 sólo se utilizó el PIF y en el 2017 y 2018 se utilizaron los genotipos PIF, TR1 Y TR4.

Se utilizaron semillas de PIF, TR1 y TR4 (dependiendo del año experimental) que se formaron en ambientes maternos contrastantes de disponibilidad hídrica. Estas semillas fueron recolectadas de la cosecha de los experimentos de “nivel planta individual” descriptos en el punto anterior. Tal es así que del experimento a nivel planta individual del año 2015 se utilizaron semillas del genotipo PIF para realizar el experimento 2016 y de los experimentos a nivel planta de los años 2016 y 2017 se utilizaron las semillas de los genotipos PIF, TR1 y TR4 para el experimento 2017 y 2018, respectivamente. Un pool de semillas fue de la progenie de plantas que estuvieron en una condición hídrica con riego (Regado- $PIF_R$   $TR1_R$  y  $TR4_R$ ) y otro pool de semillas de la progenie de plantas que

estuvieron en una condición de déficit hídrico (Déficit hídrico - PIF<sub>DH</sub>, TR1<sub>DH</sub> y TR4<sub>DH</sub>) desde el estado ontogénico Z1.5 a Z6.9 + 5 días (Zadoks et al., 1974).

Los experimentos se condujeron en contenedores plásticos de 1m<sup>3</sup> (1mx1mx1m) rellenos con una mezcla 2:1 de arena y tierra. En cada contenedor se sembraron ocho líneas, de las cuales tres hileras fueron sembradas con semillas provenientes del tratamiento riego (Regado - PIF<sub>R</sub>, TR1<sub>R</sub> y TR4<sub>R</sub> respectivamente), otras tres hileras con semillas provenientes del tratamiento de déficit hídrico (Déficit hídrico - PIF<sub>DH</sub>, TR1<sub>DH</sub> y TR4<sub>DH</sub> respectivamente) y dos hileras de bordura con PIF. En el caso del experimento del año 2016, tal como se mencionó anteriormente, se sembró todo el contenedor con PIF respetando dentro de este el origen del ambiente materno. Esta aproximación permitió establecer un “microcultivo” ya que se sembró a una densidad agronómica (200 pl m<sup>-2</sup>) y con una distancia entre hileras de 12 cm (25 plantas por m lineal). La densidad que se logró fue uniforme dado que los genotipos fueron sembrados a mano utilizando una cinta de papel engomada y biodegradable donde cada semilla se distanció a 4 cm una de la otra de manera uniforme asegurando la densidad final deseada. Las semillas provenientes de ambos ambientes contrastantes se sembraron en hileras aleatorizadas dentro de cada contenedor, que correspondió a una condición hídrica. Los tratamientos de condición hídrica impuestos fueron el control (Regado) donde se mantuvo a capacidad de campo correspondiente a un porcentaje de humedad que varía entre 10 y 15% durante todo el ciclo del cultivo y déficit hídrico similar al descrito en el punto anterior para planta individual con un porcentaje de humedad alrededor del 5% (Figura 2.5).

Las valores de porcentaje de humedad fueron obtenidos a través del muestreo de suelo en distintos momentos de la imposición del tratamiento de “déficit hídrico” registrando el peso húmedo y seco de las muestras de suelo para estimar el porcentaje de humedad.



**Figura 2.5.** Dinámica del porcentaje de humedad del suelo en los contenedores en función de los días desde la siembra. La línea continua representa el tratamiento regado y la línea punteada al déficit hídrico (DH). La barra horizontal indica el periodo en que se impuso el déficit hídrico coincidente con el periodo crítico del cultivo.

La fecha de siembra para los tres años de experimentos fue el 24 de mayo y el diseño experimental fue de parcelas subdivididas completamente aleatorizadas con tres repeticiones donde la parcela principal fue la condición hídrica, la subparcela el genotipo y la sub-subparcela el ambiente materno donde se originaron.

### 2.3.2 Experimentos en condiciones a campo

Se realizaron tres experimentos a campo en ambientes diferentes. Dos de los experimentos se llevaron a cabo en el Campo experimental del INTA Bordenave (37° 46'S, 63°05' O), provincia de Buenos Aires (Argentina), durante los años 2017 y 2018. El tercer

experimento se realizó en el Campo Experimental del Departamento de Producción Vegetal de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires (34° 35'S, 58°29'O), Ciudad de Buenos Aires (Argentina), durante el año 2018.

El suelo del campo de la localidad de Bordenave es un Haplustol éntico el cual está en relación directa con la cantidad y distribución de las precipitaciones que reciben. Tiene valores de constantes de hídricas de 150 mm para capacidad de campo, de 77 mm para punto de marchitez permanente y 73 mm de agua útil en un metro de profundidad. En cambio, el campo de la Facultad de Agronomía es un Argiudol vértico, donde sus constantes hídricas son de 482 mm de capacidad de campo, 282 mm como punto de marchitez permanente y 200 mm de agua útil en un metro de profundidad. En el año 2017 se realizó una siembra a campo en la localidad de Bordenave con semillas provenientes de plantas individuales. El objetivo de este experimento fue realizar un *screening* para evaluar la performance de plantas originadas a partir de granos de plantas individuales de PIF, TR1, TR4 y una línea segregante no transgénica (SNT) como control. La evaluación consistió en analizar estas líneas en términos de rendimiento a los efectos de seleccionar las que mejor rendimiento por unidad de área tuvieron en condiciones de campo dentro de cada evento transgénico. La siembra se realizó el 17 de Julio de 2017, utilizando hileras de 1 m de largo separadas a 20 cm por cada una de las plantas con tres repeticiones siguiendo un diseño completamente aleatorizado. El experimento se condujo en condiciones de secano, aplicando riego sólo cuando fue necesario para evitar estreses extremos.

A partir de los resultados obtenidos en el experimento realizado en Bordenave en el año 2017, se seleccionaron dos líneas de cada uno de los eventos (TR1 y TR4) y de la SNT, en función de su performance. Estas líneas, incluido el PIF, fueron sembradas en parcelas a

campo al año siguiente en las localidades de Bordenave (INTA) y Buenos Aires (FAUBA). Así, durante 2018 se condujeron dos experimentos a campo. En Bordenave, se realizó la siembra el día 12 de Julio, y en Buenos Aires el 16 de Julio. En ambos casos se utilizaron parcelas de 5 surcos por 1 m de ancho con tres repeticiones distribuidas al azar siguiendo un diseño de parcelas divididas donde la parcela principal fue el tratamiento de condición hídrica (riego y secano) y la sub-parcela era el factor genotipo las cuales estaban dispuestas al azar. Es importante hacer notar que en el ensayo de Bordenave el genotipo PIF no fue incluido por inconvenientes con la germinación. No obstante, dentro de los genotipos evaluados se encontraban dos segregantes no transgénicos (SNT). Para generar el tratamiento de condición hídrica contrastante el cultivo fue conducido en condiciones de riego y secano en ambas localidades. El riego se realizó con sistema de riego por goteo, manteniendo el contenido hídrico del suelo cercano a capacidad de campo.

## **2.4 Condiciones meteorológicas**

### **2.4.1 Experimentos en condiciones controladas**

Los datos meteorológicos de temperatura del aire y humedad relativa fueron registrados con un sensor (HOB0 U12-013, Onset Computer Corporation) ubicado al lado del experimento. Se realizó el registro de los datos cada 15 minutos lo que permitió obtener la humedad relativa y temperatura diaria durante todo el ciclo.

En cuanto a la radiación se utilizó la base de datos de la estación meteorológica automática Castelar 1 - ICyA CIRN, Buenos Aires, Argentina ubicada a 1,3 km del experimento (<http://siga2.inta.gov.ar/#/>) considerando una disminución estimada del 40% en el interior del invernáculo (datos propios).

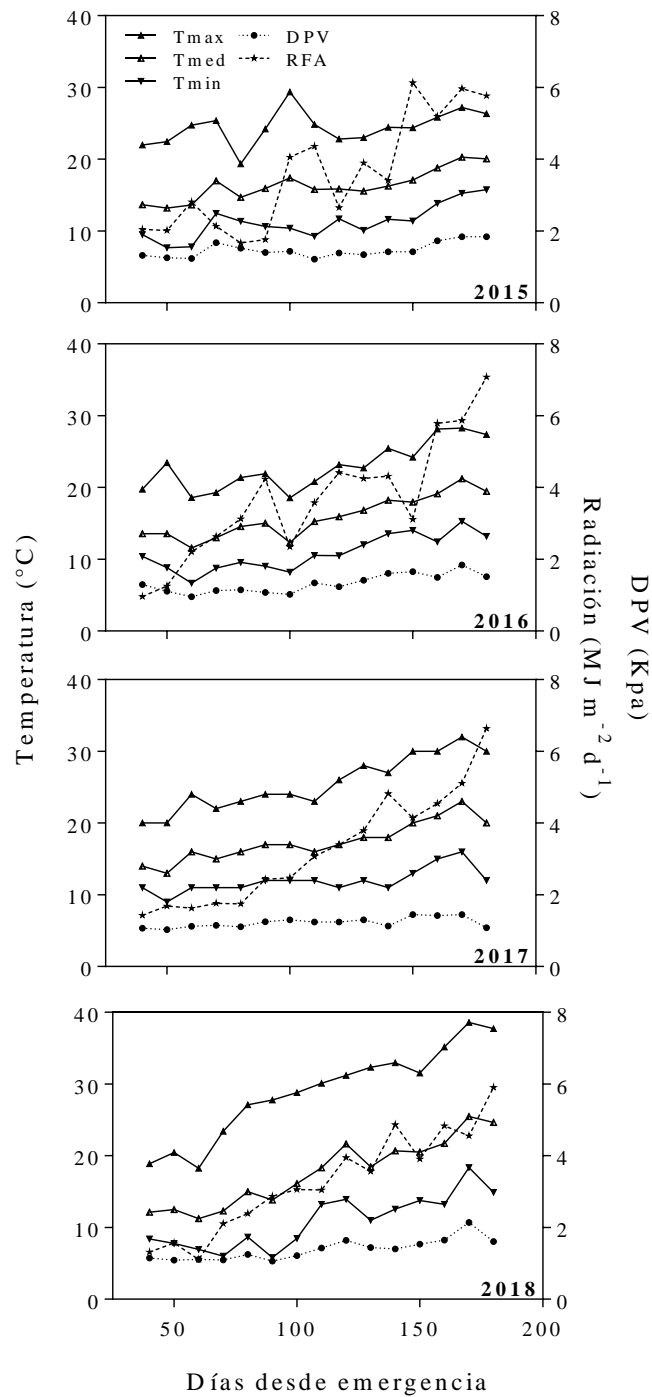
Datos climáticos: Con los datos de temperatura máxima, media y mínima, y humedad relativa obtenidos por el sensor HOBO cada 15 min, se realizó un promedio dentro de cada día para obtener un valor diario. Estos valores diarios de humedad relativa y temperatura media se utilizaron para estimar el déficit de presión de vapor (DPV, kPa), calculado como la diferencia entre la presión de vapor de aire real ( $e_a$ ) y la presión de vapor saturada ( $e_s$ ) para el día  $i$  siguiendo la ecuación de Clausius-Clapeyron.

$$e_s(i) = \exp(19.0177 - (5327 * ((T_{med}(i) + 273)^{-1}))) \quad (\text{Ecuación 2.1})$$

$$e_a(i) = e_s(i) * HR(i) * 100^{-1} \quad (\text{Ecuación 2.2})$$

donde  $T_{med}(i)$  es la temperatura media ( $^{\circ}\text{C}$ ) y  $HR(i)$  es la humedad relativa media diaria (%) del día ( $i$ ).

Para facilitar la interpretación visual de estos parámetros, como la temperatura (máxima, media y mínima), humedad relativa, déficit de presión de vapor y radiación fotosintéticamente activa, los datos se presentan como un promedio de los valores en intervalos de 10 días.



**Figura 2.6.** Condiciones meteorológicas durante el ciclo del cultivo para los años 2015, 2016, 2017 y 2018. Valores diarios (promedio decádico) de temperatura máxima (Tmax), media (Tmed), mínima (Tmin), radiación fotosintéticamente activa incidente (RFA), y déficit de presión de vapor (DPV).



#### *2.4.1.1 Experimentos a nivel planta individual*

Durante la etapa en la que estuvieron impuestos los tratamientos de estrés hídrico, coincidente con el periodo crítico del cultivo, se censó una radiación fotosintéticamente activa similar entre los tres años de experimento, la cual mostró valores promedio para dicha etapa de 3,3, 3,4 y 3,1 MJ m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> para los años 2015, 2016 y 2018, respectivamente. El déficit de presión de vapor (DPV) durante dicha etapa fue de 1,3, 1,2 y 1,5 kPa para los años 2015, 2016 y 2018, respectivamente. Con respecto a la temperatura, para la misma etapa se censaron temperaturas medias de 16,2, 14,4 y 18,7 °C para 2015, 2016 y 2018, respectivamente. Siendo durante esa etapa el 2016 el año más fresco y el 2018 el más cálido, dado que las temperaturas mínimas fueron de 10,2, 9,5 y 12,02 °C y las temperaturas máximas fueron de 25,7, 20,8 y 31,2 °C, siguiendo el orden de como fueron los ensayos (Figura 2.6). El otro parámetro evaluado fue la humedad relativa, la cual durante dicho periodo mostró un rango de 73,2 a 68,3% para los años evaluados.

En líneas generales, durante todo el ciclo ontogénico la radiación fotosintéticamente activa (RFA) en el experimento del 2018 fue más constante en comparación con el experimento del 2015 y 2016 (Figura 2.6). En los años 2015 y 2016 se observaron importantes variaciones en la RFA con picos máximos y mínimos en todo el ciclo, y sobre todo alrededor de floración. Con respecto a la temperatura media, esta fue incrementándose a medida que avanzó el ciclo, con un mayor incremento en el experimento del 2018. Asimismo, la amplitud térmica en 2018 fue mayor respecto de la observada durante 2015 y 2016. Por último, el DPV se mantuvo en los tres años alrededor de 1,4 kPa.

#### *2.4.1.2 Experimentos a nivel microcultivo*

Los experimentos a nivel microcultivo se llevaron a cabo en los años 2016, 2017 y 2018 dentro del mismo invernáculo en el que se ejecutaron los experimentos a nivel planta. En los años 2016 y 2018 las características de las condiciones ambientales en las que estuvieron expuestas las plantas del experimento a nivel planta fueron en promedio similares para las plantas de los experimentos a nivel microcultivo. Esto fue así dado que estos último fueron sembrados tres días después de sembrados los experimentos a nivel de planta por lo que el ciclo ontogénico, el momento de imposición y duración del tratamiento hídrico fueron en promedio similares.

Como se observó en el punto anterior, la radiación fotosintéticamente activa en el periodo crítico del cultivo fue en promedio para el 2016 y 2018 de  $3,2 \text{ MJ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ , a diferencia de año 2017 que fue de  $2,2 \text{ MJ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ .

El déficit de presión de vapor (DPV) en el 2017 fue de 1,2 kPa manteniéndose similar a los valores de los años de experimentos 2016 y 2018.

La temperatura dentro del invernáculo en el 2017 se mantuvo generalmente en valores intermedios a los censados en los experimentos del 2016 y 2018, tomando valores de 11,6 °C, 23,5°C y 16,4°C de temperatura mínima, máxima y media.

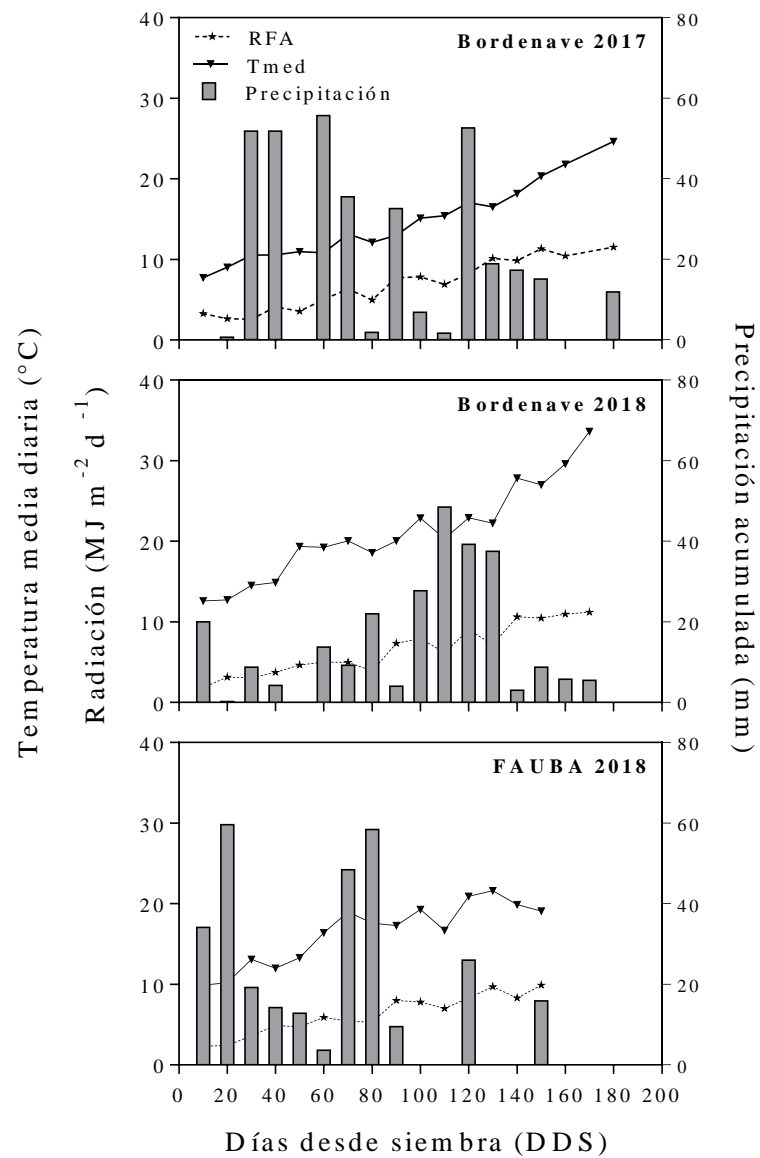
Por último, el porcentaje de humedad ambiente medido en el 2017 respecto a los otros dos años de experimento (2016 y 2018) fue similar.

#### **2.4.2 Experimentos en condiciones a campo**

Los datos meteorológicos se registraron cada hora durante todo el ciclo de cultivo. En el caso de FAUBA utilizando una estación meteorológica automática (Davis Vantage Pro2, EE.UU.) colocada en el mismo sitio donde se realizó cada experimento.

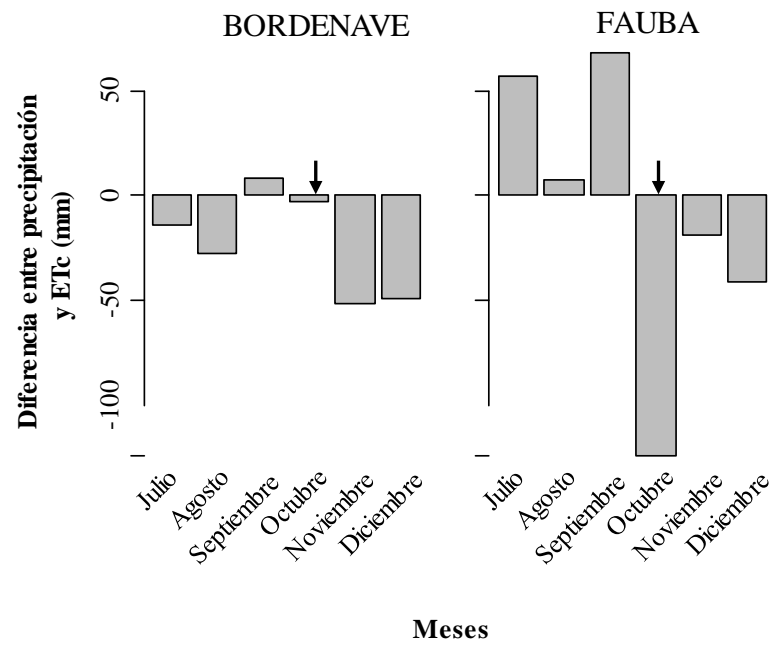
En Bordenave se utilizó la base de datos de la estación meteorológica automática ubicada en el INTA de Bordenave, Buenos Aires, Argentina ubicada cerca del experimento (<http://siga2.inta.gov.ar/#/>)

Todos los experimentos se realizaron en el comienzo de la segunda quincena de julio por lo que el ciclo del cultivo en los dos años experimentales transcurrió en el periodo comprendido entre julio y diciembre de cada año. Para el periodo julio-diciembre la radiación incidente acumulada en Bordenave 2017 (experimento correspondiente al *screening* de las líneas) fue de  $1139 \text{ MJ m}^{-2}$ , mientras que en el año 2018 dicha radiación fue de  $1101$  y  $949 \text{ MJ m}^{-2}$  en los experimentos de Bordenave y FAUBA, respectivamente. La temperatura promedio para el mismo periodo fue de  $14^{\circ}\text{C}$  en Bordenave en el año 2017, y de  $21^{\circ}\text{C}$  y  $16^{\circ}\text{C}$  en Bordenave y FAUBA, respectivamente en el 2018 (Figura 2.7).



**Figura 2.7.** Condiciones meteorológicas durante el ciclo del cultivo en el experimento de Bordenave durante los años 2017 y 2018, y en FAUBA 2018. Valores diarios (promedio decádico) de temperatura media (Tmed) y radiación fotosintéticamente activa diaria incidente (RFA). Las barras representan las precipitaciones (PP) acumuladas cada 10 días.

Las precipitaciones acumuladas fueron de 312 mm en Bordenave 2017, 258 y 301 mm en Bordenave y FAUBA 2018, respectivamente, para el periodo julio-diciembre de cada año. Aunque las precipitaciones acumuladas no fueron muy distintas, sí lo fue la distribución de estas durante el ciclo del cultivo. En el 2017 en Bordenave 85% de las precipitaciones se concentraron entre los meses de julio y mediados de noviembre, mientras que en el 2018 las precipitaciones en el experimento de Bordenave ocurrieron en mayor medida al inicio de la etapa de llenado (63% de las lluvias ocurrieron entre los meses de septiembre y octubre). En el experimento de FAUBA las precipitaciones se acumularon mayormente en la etapa previa al llenado de granos (Figura 2.7). Por lo que, en este último teniendo como referencia a la evapotranspiración del cultivo calculada con el método de Penman-Monteith, las precipitaciones no lograron cubrir el consumo de agua por parte del cultivo sobre todo en la etapa de floración (Allen et al.,2006). Distinto a lo que ocurrió en Bordenave donde en la misma etapa fenológica la evapotranspiración del cultivo fue cubierta por las precipitaciones (Figura 2.8)



**Figura 2.8.** Diferencia entre las precipitaciones y la evapotranspiración del cultivo (mm) para la localidad de Bordenave y FAUBA en los meses en que estuvo implantado el cultivo. La flecha (↓) determina la ocurrencia de la anthesis.

## 2.5 Mediciones

Las mediciones realizadas en cada experimento se detallan en cada uno de los Capítulos en el que se hace referencia a los resultados obtenidos.

## CAPÍTULO 3

---

### **RENDIMIENTO POR PLANTA Y SUS COMPONENTES FISIOLÓGICOS EN TRIGOS TRANSGÉNICOS $P_{SARK::IPT}$ FRENTE A RESTRICCIONES Y EXCESOS HÍDRICOS EN CONDICIONES CONTROLADAS**

#### **3.1 Introducción**

Los estreses abióticos, como los excesos y déficit hídricos, reducen el rendimiento del cultivo de trigo. Si bien el rendimiento en los cultivos de grano está definido por el número de granos y el peso de los mismos, el número de granos por unidad de área es el componente de rendimiento que mejor explica los cambios en el rendimiento (Fischer, 1985; Slafer y Andrade, 1993; Slafer et al., 1994; Miralles et al., 1998; Miralles y Slafer, 1999; Borrás et al., 2004; Shearman et al., 2005; Sánchez-García et al., 2013). Aunque el número de granos se genera a lo largo de todo el ciclo del cultivo, existe una etapa crítica para su determinación ubicada en un lapso que comprende desde los 20 días previos a la floración hasta los 10 días posteriores a dicho estadio y es denominado periodo crítico, tal como fue explicado anteriormente en el Capítulo 1 (Fischer, 1985; Savin y Slafer, 1991; Slafer y Andrade, 1993; Abbate, et al., 1995). Cualquier estrés hídrico, sea por exceso o por déficit, que ocurra durante el periodo crítico, reducirá la tasa de crecimiento de las espigas y su peso final, y por lo tanto redundará en un menor número de granos por espiga y un menor rendimiento (Setter et al., 1999; Hoffman et al., 2008; Araki et al., 2012; de San

Celedonio et al., 2014). En línea con lo antes expuesto, además de generarse una reducción de la biomasa aérea también se ve reducida la biomasa radical (de San Celedonio et al., 2017).

Un estrés hídrico (por exceso o por déficit) produce un incremento en la senescencia foliar, la cual está regulada por la expresión coordinada de genes específicos (Buchanan-Wollaston, 1997; Chandlee, 2001; Yoshida, 2003; Lim, et al. 2007; Farooq et al., 2009; Mittler y Blumwald, 2010). La senescencia foliar genera una disminución del área foliar verde afectando negativamente tanto al número de granos como al peso de estos, dependiendo de la etapa de desarrollo en la que ocurra, i.e. durante el periodo crítico o durante el llenado de granos, respectivamente (Madden y Nutter, 1995). Los genes que participan durante la senescencia, llamados Genes Asociados a la Senescencia (SAGs), se han identificado en especies como *Arabidopsis*, nabo y arroz (Buchanan-Wollaston, 1997; Gan y Amasino, 1997; Quirino et al., 1999; Lee et al., 2001; Yoshida, 2003; Guo et al., 2004; Liu et al., 2008). Los elementos génicos que controlan la expresión de los SAG han sido usados como estrategia para generar una autorregulación del sistema de inhibición de la senescencia. En este sentido, diferentes trabajos mencionan (tal como fue indicado en el Capítulo 1) el uso de construcciones para realizar transgénesis, donde se colocó el gen que codifica para la enzima adenosina fosfato isopenteniltransferasa (IPT) aislado de *Agrobacterium tumefaciens* bajo el control transcripcional del promotor específico asociado a la senescencia (SAGs), el cual fue aislado de poroto (*Phaseolus vulgaris* L.) denominado Receptor proteína-Kinasa Asociado a la Senescencia (SARK, Hajouj et al., 2000). Construcciones génicas donde la expresión del gen *ipt* está regulada por el promotor SARK, el cual es inducible por maduración y estrés, se introdujeron en plantas



dicotiledóneas y monocotiledóneas (Rivero et al., 2007; Rivero et al., 2009; Peleg et al., 2011; Qin et al., 2011; Oneto et al., 2016). La enzima codificada por el gen *ipt* tiene como función catalizar el paso limitante en la ruta de biosíntesis de citoquininas (Akiyoshi et al., 1984; Barry et al., 1984). Por ello, la sobreexpresión de este gen provoca un aumento de los niveles endógenos de citoquininas respecto a las plantas *wild type*, reduciendo la senescencia foliar e induciendo la tolerancia a estreses que aceleran la senescencia (Howell et al., 2003). Hay evidencias de plantas P<sub>SARK</sub>::IPT de tabaco, de maní, algodón, arroz y maíz que han expresado un mantenimiento del rendimiento fotosintético y un retraso en la senescencia de las hojas ante la exposición a condiciones de estrés hídrico (Rivero et al., 2007, 2010; Qin et al., 2011; Peleg et al., 2011; Kuppu et al., 2013; Oneto et al., 2016). En el caso de cultivares de maní y arroz en los que se introgresó el transgén P<sub>SARK</sub>::IPT han mostrado un aumento del rendimiento en grano ante condiciones de estrés hídrico, respecto a las plantas testigo, debido a cambios en la relación fuente: destino dando como resultado un mayor número de granos (Qin et al. 2011; Peleg et al., 2011).

En base a estos estudios y en el marco de la tesis, los objetivos de este capítulo fueron caracterizar el rendimiento y sus atributos fisiológicos (biomasa, índice de cosecha, peso y número de granos, etc.) en plantas de trigo transformadas con el transgén P<sub>SARK</sub>::IPT y compararlas con plantas control frente a restricciones y excesos hídricos durante el periodo crítico del cultivo. Además, se analizó la partición entre la biomasa aérea y radical en plantas transformadas con el transgén P<sub>SARK</sub>::IPT (y su comparación con los controles) (Objetivos particulares I y II).

### **3.2 Materiales y métodos**

### 3.2.1 Condiciones generales, diseño experimental y tratamientos

Este capítulo aborda los experimentos a nivel planta que fueron conducidos bajo condiciones controladas. Las condiciones generales, diseño experimental y tratamientos fueron descritos en el Capítulo 2 de la tesis (Materiales y Métodos) en la sección 2.3.1 “Experimentos a nivel planta individual”.

Para los tres años de experimentos 2015, 2016 y 2018, el inicio y la finalización del estrés hídrico fue alrededor de los 80 y 119 días desde la emergencia (DDE) de las plantas, respectivamente (Cuadro 3.1). Dentro de esta etapa en la que se ejecutaron los tratamientos con las distintas condiciones hídricas estuvo ubicado el periodo crítico para la definición del rendimiento en grano.

**Cuadro 3.1.** Inicio y fin de los tratamientos de estrés hídrico en días desde emergencia para los tres años de experimento 2015, 2016 y 2018.

	2015	2015	2018
	Días desde siembra (DDE)		
<b>Inicio de estrés hídrico</b>	79	71	91
<b>Fin de estrés hídrico</b>	117	114	126

### 3.2.2 Mediciones realizadas

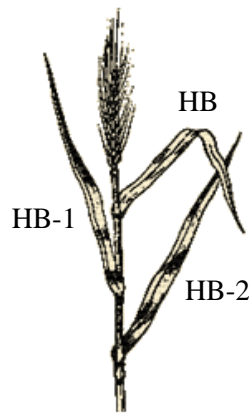
#### 3.2.2.1 Fenología y aparición de hojas

La determinación de la fenología durante todo el ciclo ontogénico se realizó utilizando el código decimal Zadoks et al. (1974). Las etapas fenológicas del cultivo que se registraron fueron emergencia (Z1.0), segundo nudo (Z3.2) y floración (Z6.5) como referentes para ubicar dentro del ciclo los tratamientos de condición hídrica.

En conjunto con el seguimiento de la fenología, se registró la dinámica de aparición de hojas en el vástago principal. Para ello se marcaron dos plantas de cada genotipo dentro de cada tratamiento y se siguió la aparición de hojas cada 3-4 días desde la emergencia hasta la floración utilizando la escala propuesta por Haun (1973).

### 3.2.2.2 Área foliar verde e índice de verdor

Para cuantificar el área foliar verde se utilizaron las mismas plantas que fueron marcadas para seguir la fenología y la dinámica de aparición de hojas. La medición se inició una vez que se observó que la hoja bandera del vástago principal estaba totalmente expandida (Z3.9) con la lígula visible. Desde ese momento se midió, sobre el vástago principal, dos veces por semana el ancho y largo (en cm) del sector verde de la hoja bandera (HB) y de las dos hojas inmediatamente por debajo de la misma (HB-1 y HB-2; Figura 3.1). La medición de largo y ancho de hoja se realizó en los años 2016 y 2018.



**Figura 3.1.** Esquema del vástago principal detallando la posición de la hoja bandera (HB) y las inmediatamente posteriores a la misma.

De manera simultánea al momento en que se tomaron los datos para el cálculo del área foliar se midió en el vástago principal, en las mismas hojas (HB, HB-1 y HB-2), el contenido de clorofila de manera no destructiva utilizando un medidor de clorofila SPAD-

502 (Minolta, Milton Keynes, UK). Esta medición se realizó en los tres años experimentales.

Las mediciones de área foliar verde e índice de verdor SPAD se realizaron hasta la senescencia total de cada hoja.

### *3.2.2.3 Biomasa aérea y radical*

Se realizaron muestreos de biomasa aérea en tres momentos del ciclo ontogénico para su posterior análisis. Los muestreos se llevaron a cabo al momento de imponerse y al finalizar los tratamientos de estrés hídrico, y el tercer muestreo fue al finalizar el ciclo del cultivo. El primer muestreo se ejecutó cuando el cultivo comenzaba a encañar (Z3.2), el siguiente fue a los diez días de ocurrida la antesis (Z6.9 + 10 días) y el último a madurez de cosecha. El primer muestreo se realizó a los 79, 71 y 91 días desde emergencia (DDE) para los años 2015, 2016 y 2018 respectivamente (Cuadro 3.1). En el primer muestreo se tomaron al azar 8 plantas de cada genotipo (Cuadro 3.2). En el segundo muestreo, que coincidió con el momento en que se liberó el estrés hídrico, se extrajeron 8 tubos al azar de cada genotipo en cada uno de los tratamientos a los 106 y 104 DDE en el 2015 y 2016 respectivamente y 4 tubos a los 131 DDE el 2018 (Cuadro 3.1, Cuadro 3.2). El resto de los tubos, 8 de cada genotipo en cada uno de los tratamientos, siguieron su curso con riego normal hasta madurez de cosecha, momento del tercer muestreo.

**Cuadro 3.2.** Números de plantas muestreadas al inicio y fin de la imposición del estrés hídrico y a madurez, para los tres años de experimento 2015, 2016 y 2018 en cada tratamiento de condición hídrica.

Año	Genotipo	Inicio de estrés hídrico (Segundo nudo)	Fin de estrés hídrico (Diez días post- antesis)	Madurez de cosecha
2015	PIF	8	8	8
	TR1	8	8	8
	TR4	8	8	8
2016	PIF	8	8	8
	TR1	8	8	8
	TR4	8	8	8
2018	PIF	8	4	8
	TR1	8	4	8
	TR4	8	4	8

En todos los casos, y en cada uno de los muestreos, la planta se separó por estrato (vástago principal y macollos) y dentro de ellos se separó la biomasa vegetativa de las espigas (éstas últimas sólo existían en los dos últimos muestreos que fueron post-floración). En cosecha (tercer muestreo) se determinó el rendimiento y sus principales componentes (número de granos, peso promedio de los mismos, espigas  $m^{-2}$ , granos por espiga). Las espigas fueron contadas y luego trilladas para obtener el rendimiento en grano. El peso promedio individual de los granos se midió en dos submuestras de 50 granos y se utilizó para calcular el número de granos por planta y el número de granos por espiga en cada muestra.

Una vez procesados los muestreos, el material vegetal se llevó a estufa a 60 °C durante 72 hs para luego registrar el peso seco de cada una de las muestras. En el muestreo de cosecha, los granos no siguieron este protocolo de secado con el objetivo de mantener la viabilidad de los mismos. El peso seco de los granos se determinó en función de su contenido de humedad determinada con un humidímetro (WILE 55).

Además del muestreo de biomasa aérea total, se realizó el muestreo de biomasa radical total al momento de imponerse y al finalizar los tratamientos de Déficit hídrico y Anegado. Para ello, se retiró toda la mezcla de tierra y arena del tubo que contenía el sistema radical de la planta y se lavó cuidadosamente en su totalidad utilizando tamices de 1 mm de malla. Se descartó manualmente en cada una de las muestras las raíces muertas (identificadas por apreciación visual) y los restos de materia orgánica. Una vez obtenida la biomasa radical totalmente limpia se tomó una submuestra representativa y digitalizó a 400 dpi con un escáner doble (Dual Scan EPSON STD4800), el cual fue optimizado y calibrado para el análisis de raíces por Regent Instruments Inc. Las imágenes se analizaron con el programa WinRHIZO Pro 2012b (Regent Instruments Inc., Canadá) para la determinación de la longitud total de raíces por planta y diámetro promedio radical. Luego las muestras de raíces se colocaron en estufa a 60 °C durante 72 hs y se determinó el peso seco de las raíces por planta.

#### 3.2.2.4 Análisis de los datos

Fenología: La duración de las etapas fenológicas se expresaron en tiempo térmico acumulado el cual fue calculado utilizando la siguiente fórmula:

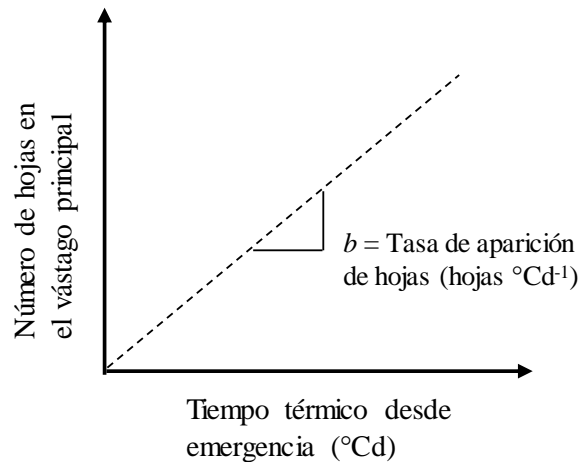
$$TT (^{\circ}Cd) = \Sigma (T_m - T_b) \quad (Ecuación 3.1)$$

donde TT es el tiempo térmico acumulado para una etapa determinada del ciclo ontogénico del cultivo,  $T_m$  es la temperatura media diaria y  $T_b$  es la temperatura base ( $0^{\circ}\text{C}$ ; Cao y Moss, 1989).

Dinámica de aparición de las hojas: La aparición del número de hojas en el vástago principal fue relacionada con el tiempo térmico acumulado desde la emergencia utilizando un modelo lineal (Figura 3.2):

$$y = a + b \cdot x \quad (\text{Ecuación 3.2})$$

siendo:  $y$  el número de hojas aparecidas en el vástago principal (VP),  $a$  la ordenada al origen,  $b$  la tasa de aparición de hojas ( $\text{hoja } ^{\circ}\text{Cd}^{-1}$ ; TAH) y  $x$  el tiempo térmico acumulado desde emergencia. El filocrono ( $^{\circ}\text{Cd hoja}^{-1}$ ) fue estimado como la inversa de  $b$ .



**Figura 3.2.** Esquema teórico del modelo lineal de la relación entre el número de hojas aparecidas en el vástago principal y el tiempo térmico desde la emergencia del cultivo ( $^{\circ}\text{Cd}$ ) para determinar los parámetros de la Ecuación 3.2:  $a$ , ordenada al origen y  $b$ , tasa de aparición de hojas

Área foliar verde, su evolución y área bajo la curva: Con los datos obtenidos en las mediciones de largo y ancho del sector verde de cada hoja se procedió a hacer el cálculo del área foliar verde por hoja en base a la fórmula propuesta por Miralles y Slafer (1991):

$$AFV_{ij} = L_{ij} * A_{ij} (cm) * 0,835 \quad (Ecuación 3.3)$$

donde:  $AFV_{ij}$  es el área foliar de la hoja  $i$  el día  $j$  ( $cm^2$ ),  $L_{ij}$  su largo (cm),  $A_{ij}$  su ancho máximo (cm), y 0,835 un factor de corrección.

Luego, se analizó el AFV de cada hoja relativizando el valor de cada una respecto a su valor máximo, correspondiente al inicio de la medición.

$$AFVR_{ij} = AFV_{ij} * AFV_{max_i}^{-1} \quad (Ecuación 3.4)$$

donde:  $AFV_{ij}$  es el área foliar verde relativa (%) de la hoja  $i$  el día  $j$ ,  $AFV_{ij}$  es el área foliar verde ( $cm^2$  hoja $^{-1}$ ) de la hoja  $i$  el día  $j$ ,  $AFV_{max_i}^{-1}$  es el valor máximo de área foliar verde ( $cm^2$  hoja $^{-1}$ ).

Los valores de  $AFVR_{ij}$  (Ecuación 3.4) fueron utilizados para analizar la evolución en función del tiempo del área foliar verde ajustados con ecuaciones lineales o bilineales, dependiendo el caso, mediante el programa GraphPad (Motulsky y Christopulos, 2003). Para realizar un ajuste lineal se utilizó la ecuación:

$$AFVR_i = a + b * x \quad (Ecuación 3.5)$$

donde:  $AFVR_i$  es el valor de área foliar verde relativa de la hoja  $i$  ( $cm^2$  hoja $^{-1}$ ),  $a$  es el valor de  $AFVR$  al día de inicio de la medición que coincide con el valor máximo,  $b$  es la tasa relativa de senescencia foliar (% d $^{-1}$ ), y  $x$  son los días desde inicio de la medición (a partir de hoja completamente expandida)

Para los ajustes bilineales se consideró la siguiente ecuación:

$$AFVR_i = a + b * x (si \ x \leq c) + b * c (x > c) + d * (x - c) (si \ x > c) \quad (Ecuación 3.6)$$

donde:  $AFVR_i$  es el valor de área foliar verde relativa de la hoja  $i$  ( $cm^2$  hoja $^{-1}$ ),  $a$  es el valor de  $AFVR$  al día de inicio de la medición que coincide con el valor máximo,  $b$  es la primer tasa relativa de senescencia foliar (% d $^{-1}$ , Tasa de senescencia I),  $c$  es el día desde inicio de



la medición hasta el día en que la tasa de senescencia foliar cambia,  $d$  es la segunda tasa relativa de senescencia foliar (% d<sup>-1</sup>, Tasa de senescencia II), y  $x$  son los días desde inicio de la medición (a partir de hoja completamente expandida).

Los valores de  $AFVR_i$  estimados a través de las *Ecuaciones 3.5 a 3.6* fueron analizados como valores relativos, los cuales variaron entre 0 y 1, representando el valor 1 el valor máximo.

En base a estos ajustes se calculó la duración del área foliar verde relativa como la integral bajo la curva de la evolución del área foliar verde de la hoja en función del tiempo.

*Evolución del índice de verdor y área bajo la curva:* De la misma manera se procedió con los datos de SPAD, donde la evolución en función del tiempo del índice de verdor SPAD relativo al máximo se ajustó a una función bilineal similar a la planteada para  $AFVR_i$  en la *Ecuación 3.6*:

$$SPAD_i = a + b * x \text{ (si } x \leq c) + b * c \text{ (} x > c) + d * (x - c) \text{ (si } x > c) \quad (\text{Ecuación 3.7})$$

donde:  $SPAD_i$  es el valor relativo de SPAD de la hoja  $i$ ,  $a$  es el valor de  $SPAD$  al día de inicio de la medición,  $b$  es la primer tasa de caída de los valores de SPAD (SPAD d<sup>-1</sup>, Tasa de caída de los valores de SPAD I),  $c$  es el día desde inicio de la medición en el que la tasa de caída de los valores de SPAD cambia,  $d$  es la segunda tasa de caída de los valores de SPAD (SPAD d<sup>-1</sup>, Tasa de caída de los valores de SPAD II), y  $x$  son los días desde inicio de la medición a partir de hoja totalmente expandida. Los valores relativos de SPAD obtenidos fueron analizados como valores relativos los cuales variaron entre 0 y 1, representando el valor 1 el valor máximo.

A través de este ajuste se calculó el área bajo la curva de la evolución del SPAD en función de los días.

Datos del rendimiento en grano y componentes numéricos: Se realizó un análisis del rendimiento en granos discriminando entre vástago principal y macollos.

Para el análisis de los componentes principales y sub-componentes que conforman el rendimiento se utilizó los valores de planta entera, o segregados entre el vástago principal y los macollos, relativizando los resultados de los eventos transgénicos respecto a su control (PIF).

Análisis estadístico: Para el análisis de los datos se utilizó el programa InfoStat Profesional v.1.1 (Di Renzo et al., 2011), el cual permitió realizar la prueba de diferencias estadísticas entre los tratamientos mediante análisis de varianza (ANVA). Las medias de los tratamientos se compararon con el test LSD (Least significant difference) de Fisher con un nivel de significación de 0,05.

### **3.3 Resultados**

#### **3.3.1 Fenología y aparición de hojas**

En cada uno de los años, los genotipos (PIF, TR1 y TR4) presentaron similar fenología cuando fueron comparados para las distintas condiciones hídricas (Regado, Anegado y Déficit hídrico). Por lo que el factor genotipo, la condición hídrica y su combinación no modificaron la duración del ciclo ontogénico ( $p \geq 0,05$ ) (Cuadro 3.3). La duración de la fase de emergencia a floración (Em - Fl; °Cd) de los genotipos, en todos los tratamientos, fue 1610, 1379 y 1640°Cd para los experimentos del 2015, 2016 y el 2018, respectivamente. Esta respuesta se reflejó en el número final de hojas (NFH) del vástago principal, el cual fue similar en todos los genotipos y tratamientos para cada año ( $p \geq 0,05$ ; Cuadro 3.3). La tasa de aparición de hojas (TAH) se diferenció de manera significativa en dos de los tres años ( $p < 0,01$ , 2016 y 2018) y en el experimento 2015 también se

observaron diferencias entre tratamientos ( $p < 0,01$ ). La misma respuesta se observó para el filocrono en todos los casos. En ningún caso se observó interacción entre los genotipos y los tratamientos ( $p \geq 0,05$ ).

**Cuadro 3.3.** Tasa de aparición de hojas en el vástago principal (TAH; hojas  $\text{pl}^{-1} \text{ } ^\circ\text{Cd}^{-1} \times 1000$ ), filocrono (Fil;  $^\circ\text{Cd}$  hoja $^{-1}$ ) y número final de hojas en el vástago principal (NFH; hoja  $\text{pl}^{-1}$ ) para las distintas condiciones hídricas y genotipos en los experimentos 2015, 2016 y 2018. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) por el Test LSD de Fischer.

Condición hídrica (CH)	Genotipo (G)	2015			2016			2018		
		TAH	Fil	NFH	TAH	Fil	NFH	TAH	Fil	NFH
Regado	PIF	8,9 <sup>bcd</sup>	112,6 <sup>bcd</sup>	11,5 <sup>a</sup>	8,2 <sup>ab</sup>	121,5 <sup>ab</sup>	10,0 <sup>a</sup>	7,4 <sup>abc</sup>	134,4 <sup>abcd</sup>	10,0 <sup>a</sup>
	TR1	9,4 <sup>a</sup>	106,2 <sup>e</sup>	11,5 <sup>a</sup>	8,5 <sup>ab</sup>	117,1 <sup>ab</sup>	9,5 <sup>ab</sup>	7,6 <sup>ab</sup>	131,3 <sup>bcd</sup>	10,0 <sup>a</sup>
	TR4	9,0 <sup>bc</sup>	111,6 <sup>d</sup>	10,5 <sup>a</sup>	8,0 <sup>b</sup>	124,9 <sup>a</sup>	9,5 <sup>ab</sup>	8,1 <sup>a</sup>	123,8 <sup>d</sup>	10,0 <sup>a</sup>
Anegado	PIF	8,6 <sup>de</sup>	116,6 <sup>a</sup>	11,0 <sup>a</sup>	8,6 <sup>a</sup>	115,7 <sup>b</sup>	10,0 <sup>a</sup>	7,0 <sup>bc</sup>	142,9 <sup>ab</sup>	10,0 <sup>a</sup>
	TR1	8,9 <sup>bc</sup>	112,0 <sup>cd</sup>	11,0 <sup>a</sup>	8,1 <sup>ab</sup>	122,7 <sup>ab</sup>	9,0 <sup>b</sup>	7,1 <sup>bc</sup>	141,1 <sup>abc</sup>	10,0 <sup>a</sup>
	TR4	8,5 <sup>e</sup>	117,6 <sup>a</sup>	11,0 <sup>a</sup>	8,6 <sup>a</sup>	115,8 <sup>b</sup>	9,5 <sup>ab</sup>	7,9 <sup>a</sup>	125,7 <sup>d</sup>	10,0 <sup>a</sup>
Déficit hídrico	PIF	8,4 <sup>e</sup>	119,0 <sup>a</sup>	11,0 <sup>a</sup>	8,5 <sup>ab</sup>	116,9 <sup>ab</sup>	10,0 <sup>a</sup>	7,4 <sup>abc</sup>	136,0 <sup>abcd</sup>	10,0 <sup>a</sup>
	TR1	9,5 <sup>b</sup>	110,6 <sup>d</sup>	11,5 <sup>a</sup>	8,4 <sup>ab</sup>	119,5 <sup>ab</sup>	9,0 <sup>b</sup>	6,7 <sup>c</sup>	148,5 <sup>a</sup>	9,5 <sup>a</sup>
	TR4	8,6 <sup>cde</sup>	115,8 <sup>abc</sup>	11,0 <sup>a</sup>	8,4 <sup>ab</sup>	119,0 <sup>ab</sup>	10,0 <sup>a</sup>	7,8 <sup>a</sup>	127,0 <sup>cd</sup>	10,0 <sup>a</sup>
G		**	**	ns	ns	ns	ns	*	*	ns
CH		**	**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
G×CH		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

ns=diferencias no significativas; ns  $p \geq 0,05$ ; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

### 3.3.2 Duración del área foliar verde relativa e índice de verdor relativo

La dinámica del área foliar verde de las hojas medidas en el vástago principal de las plantas de los trigos transgénicos  $P_{SARK::IPT}$  siguió la misma respuestas al PIF en cada

condición hídrica, de manera similar ocurrió con los valores de SPAD sin mostrar diferencias relevantes entre genotipos. Para una mejor interpretación de los resultados se analizaron los valores relativos de cada hoja tanto de área foliar como de SPAD a su valor máximo, correspondiente al inicio de la medición.

La duración del área foliar verde relativa, analizada en las tres hojas superiores del vástago principal, hoja bandera (HB) y las dos ubicadas inmediatamente por debajo (HB-1 y HB-2), no presentó diferencias significativas entre genotipos en ninguna de las hojas ( $p \geq 0,05$ ), excepto en el caso de TR4 en el experimento del 2016 en HB en condición con riego que fue menor. Estos resultados fueron consistentes en ambos años de experimentos. Entre tratamientos sí hubo diferencias significativas en todos los años de experimentación para todas las hojas (Cuadro 3.4). En todos los genotipos y para todas las posiciones de hoja, el área bajo la curva se redujo un 57% en el 2016 y 46% en el 2018 cuando las plantas fueron sometidas a una condición hídrica de anegamiento, mientras que en una condición de déficit hídrico la disminución del área bajo la curva fue del 16 y 29% para el año 2016 y 2018, respectivamente, cuando se compararon los valores respecto del control.

**Cuadro 3.4.** Duración del área foliar verde relativa de la hoja bandera (HB) y de las dos hojas por debajo de la misma (HB-1 y HB-2) para las distintas condiciones hídricas y genotipos en los experimentos 2016 y 2018. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) por el Test LSD de Fischer.

Duración del área foliar verde relativa de la hoja (día)							
Condición hídrica (CH)	Genotipo (G)	2016			2018		
		HB	HB-1	HB-2	HB	HB-1	HB-2
Regado	PIF	55,2 <sup>a</sup>	55,5 <sup>a</sup>	35,6 <sup>a</sup>	31,1 <sup>abcd</sup>	33,3 <sup>a</sup>	26,5 <sup>a</sup>
	TR1	53,2 <sup>a</sup>	46,5 <sup>a</sup>	38,2 <sup>a</sup>	33,3 <sup>ab</sup>	29,0 <sup>ab</sup>	25,5 <sup>a</sup>
	TR4	18,1 <sup>c</sup>	42,3 <sup>ab</sup>	35,6 <sup>a</sup>	38,4 <sup>a</sup>	20,5 <sup>bc</sup>	24,5 <sup>a</sup>
Anegado	PIF	20,0 <sup>c</sup>	21,8 <sup>bc</sup>	16,2 <sup>a</sup>	23,0 <sup>cd</sup>	11,5 <sup>c</sup>	12,0 <sup>b</sup>
	TR1	22,5 <sup>bc</sup>	22,8 <sup>bc</sup>	19,0 <sup>a</sup>	22,5 <sup>d</sup>	12,3 <sup>c</sup>	12,0 <sup>b</sup>
	TR4	16,2 <sup>c</sup>	17,4 <sup>c</sup>	14,2 <sup>a</sup>	26,0 <sup>bcd</sup>	11,5 <sup>c</sup>	11,5 <sup>b</sup>

Déficit hídrico	PIF	35,9 <sup>abc</sup>	40,2 <sup>ab</sup>	34,0 <sup>a</sup>	33,2 <sup>ab</sup>	18,7 <sup>bc</sup>	10,2 <sup>b</sup>
	TR1	37,6 <sup>abc</sup>	34,3 <sup>abc</sup>	24,5 <sup>a</sup>	31,6 <sup>abcd</sup>	20,0 <sup>bc</sup>	11,7 <sup>b</sup>
	TR4	45,3 <sup>ab</sup>	43,4 <sup>ab</sup>	34,3 <sup>a</sup>	32,3 <sup>abc</sup>	17,2 <sup>c</sup>	10,2 <sup>b</sup>
G		ns	ns	ns	ns	ns	ns
CH		**	**	**	**	**	**
G×CH		ns	ns	ns	ns	ns	ns

ns=diferencias no significativas; ns  $p \geq 0,05$ ; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

Para la integral del valor de SPAD relativo, al igual que lo ocurrido con el área bajo la curva del área foliar verde, no se observaron diferencias entre genotipos para ninguna de las distintas hojas dentro de cada tratamiento ( $p \geq 0,05$ ), sólo hubo dos excepciones: la HB en el 2015 y la HB-2 en el experimento 2016, que presentaron diferencias estadísticamente significativas. En el primer caso, dentro del tratamiento de anegamiento el TR4 se diferenció con un área bajo la curva de SPAD respecto a PIF, y dentro del tratamiento con déficit hídrico el PIF fue el que se diferenció por su mayor valor. La segunda excepción fue dada porque en el tratamiento con déficit hídrico el TR4 se diferenció de TR1 dada su mayor área bajo la curva de SPAD. Sí se observaron diferencias significativas entre tratamientos, siendo el tratamiento anegado el que presentó los menores valores del área bajo la curva de la duración del área foliar ( $p < 0,01$ ; Cuadro 3.5).

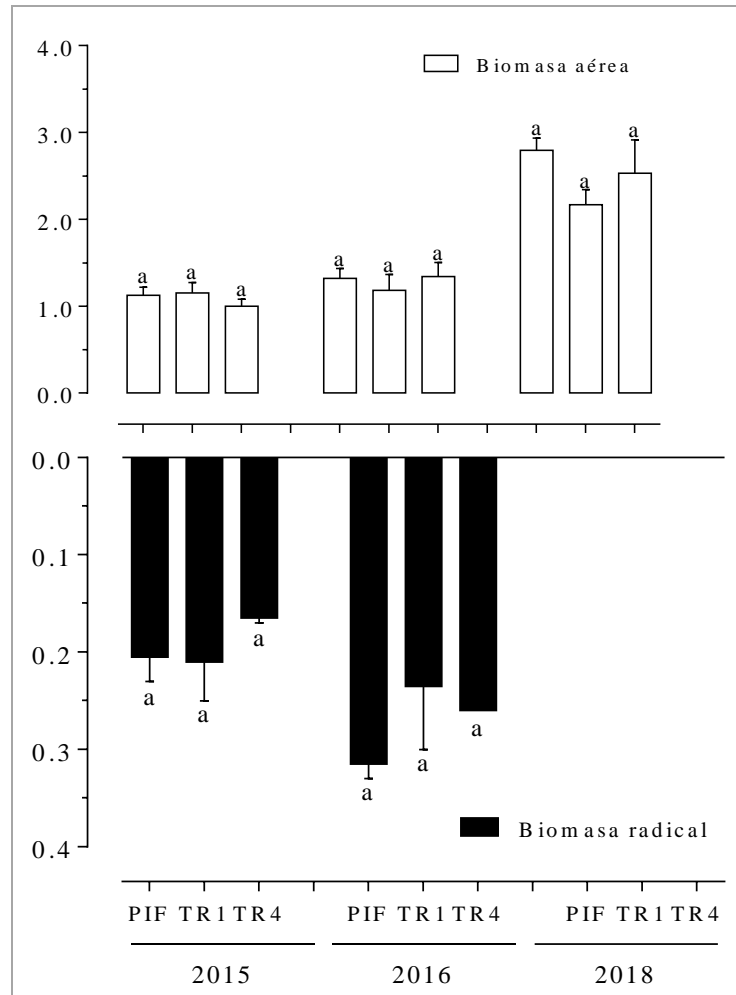
**Cuadro 3. 5.** Área bajo la curva de SPAD relativo de la hoja bandera (HB) y de las dos hojas por debajo de la misma (HB-1 y HB-2) para las distintas condiciones hídricas y genotipos en los experimentos 2015, 2016 y 2018. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) por el Test LSD de Fischer.)

Área bajo la curva de SPAD relativo (día)										
Condición hídrica (CH)	Genotipo (G)	2015			2016			2018		
		HB	HB-1	HB-2	HB	HB-1	HB-2	HB	HB-1	HB-2
Control	PIF	43,8 <sup>ab</sup>	41,5 <sup>a</sup>	34,2 <sup>b</sup>	49,6 <sup>a</sup>	45,0 <sup>a</sup>	36,5 <sup>ab</sup>	37,9 <sup>a</sup>	37,5 <sup>a</sup>	32,7 <sup>a</sup>
	TR1	44,7 <sup>ab</sup>	46,3 <sup>a</sup>	42,1 <sup>a</sup>	49,4 <sup>a</sup>	45,5 <sup>a</sup>	32,8 <sup>ab</sup>	32,1 <sup>ab</sup>	31,7 <sup>ab</sup>	28,1 <sup>ab</sup>
	TR4	46,2 <sup>a</sup>	44,2 <sup>a</sup>	43,4 <sup>a</sup>	51,0 <sup>a</sup>	43,2 <sup>a</sup>	49,0 <sup>a</sup>	31,8 <sup>ab</sup>	30,7 <sup>abc</sup>	26,6 <sup>ab</sup>
Anegado	PIF	31,3 <sup>bc</sup>	27,3 <sup>b</sup>	15,7 <sup>c</sup>	23,1 <sup>bc</sup>	19,8 <sup>b</sup>	17,4 <sup>cd</sup>	21,5 <sup>b</sup>	14,9 <sup>c</sup>	13,2 <sup>c</sup>
	TR1	17,2 <sup>cd</sup>	18,1 <sup>bc</sup>	12,7 <sup>c</sup>	17,8 <sup>c</sup>	15,5 <sup>b</sup>	11,9 <sup>d</sup>	27,7 <sup>ab</sup>	18,0 <sup>bc</sup>	14,2 <sup>c</sup>
	TR4	16,7 <sup>d</sup>	16,3 <sup>c</sup>	16,3 <sup>c</sup>	21,6 <sup>c</sup>	19,1 <sup>b</sup>	19,1 <sup>cd</sup>	31,6 <sup>ab</sup>	22,3 <sup>abc</sup>	19,0 <sup>bc</sup>
Déficit hídrico	PIF	40,0 <sup>ab</sup>	22,8 <sup>bc</sup>	15,2 <sup>c</sup>	46,7 <sup>a</sup>	43,5 <sup>a</sup>	39,6 <sup>ab</sup>	33,7 <sup>a</sup>	30,8 <sup>abc</sup>	15,0 <sup>c</sup>
	TR1	23,1 <sup>cd</sup>	17,0 <sup>bc</sup>	17,3 <sup>c</sup>	38,2 <sup>ab</sup>	32,1 <sup>ab</sup>	22,3 <sup>b</sup>	33,4 <sup>a</sup>	27,2 <sup>abc</sup>	20,9 <sup>bc</sup>
	TR4	17,2 <sup>cd</sup>	13,0 <sup>c</sup>	12,4 <sup>c</sup>	48,3 <sup>a</sup>	44,0 <sup>a</sup>	42,5 <sup>a</sup>	37,1 <sup>a</sup>	21,9 <sup>abc</sup>	15,1 <sup>c</sup>
G		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CH		**	**	**	**	***	**	**	**	**
G×CH		ns	ns	**	ns	ns	ns	ns	ns	ns

ns=diferencias no significativas; ns  $p \geq 0,05$ ; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

### 3.3.3 Biomasa aérea total y radical al momento del inicio y fin del estrés hídrico

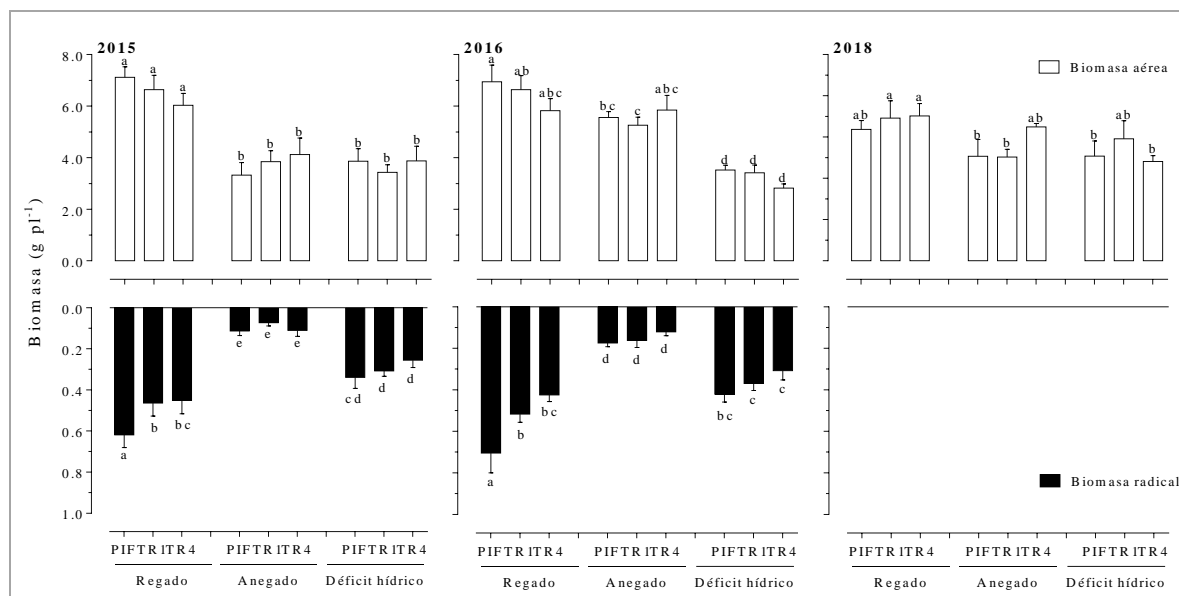
Previo al estrés, la cual era una condición de crecimiento potencial para todas las plantas, no se observaron en general diferencias estadísticamente significativas en la biomasa aérea entre los genotipos en ningún experimento. La misma respuesta se obtuvo con la biomasa radical, por lo que todos los genotipos presentaron un sistema radical homogéneo entre sí al momento de inicio de encañazón ( $p \geq 0,05$ ; Figura 3.3).



**Figura 3.3.** Peso seco por planta de biomasa aérea (panel superior) y radical (panel inferior) en el estadio de segundo nudo visible (inicio de encañazón) previo al estrés hídrico para los genotipos PIF, TR1 y TR4 en 2015, 2016 y 2018. En el año 2018 no se realizó muestreo de biomasa radical. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). Las barras verticales indican los errores estándar.

La aplicación de los tratamientos de estrés hídrico redujo significativamente la biomasa aérea de las plantas respecto de aquellas que estuvieron en condiciones potenciales de crecimiento ( $p < 0,05$ ; Figura 3.4). El periodo de estrés duró 38, 48 y 35 días para el 2015, 2016 y 2018, respectivamente (Cuadro 3.1), generando una pérdida de biomasa aérea marcada especialmente en el experimento del 2015 y de similar magnitud tanto en el anegamiento como con el déficit hídrico. En el año 2016 el impacto de ambos estreses fue

distinto ya que el déficit hídrico disminuyó en mayor medida la biomasa aérea que el tratamiento de anegamiento ( $p < 0,05$ ). Por su parte, el experimento del 2018 no manifestó grandes cambios en la biomasa ante un estrés hídrico (Figura 3.4).



**Figura 3.4.** Peso seco de biomasa aérea y radical por planta a los diez días de ocurrida la antesis para PIF, TR1 y TR4 en los distintos tratamientos (Regado, Anegado y Déficit hídrico) para los experimentos 2015, 2016 y 2018 (no se realizó muestro de biomasa radical en el 2018). Letras diferentes sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). Las barras verticales indican los errores estándar.

El análisis de la biomasa aérea a nivel genotipo durante los tres años de experimentación mostró que una vez finalizado el estrés (10 días de ocurrida la antesis) no se observaron diferencias entre la biomasa aérea de las plantas de PIF, TR1 y TR4 cuando estuvieron dentro de una misma condición hídrica ( $p \geq 0,05$ ; Figura 3.4). Sin embargo, se observaron diferencias cuando se comparó en paralelo la respuesta del mismo genotipo en las tres condiciones hídricas. En el tratamiento de anegamiento la biomasa fue reducida 32% en el TR4, 42% en TR1 y 53% en el PIF en el experimento del 2015, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. En el experimento del 2016 el genotipo TR4 no cambió su biomasa aérea como consecuencia de los tratamientos anegados y déficit hídrico

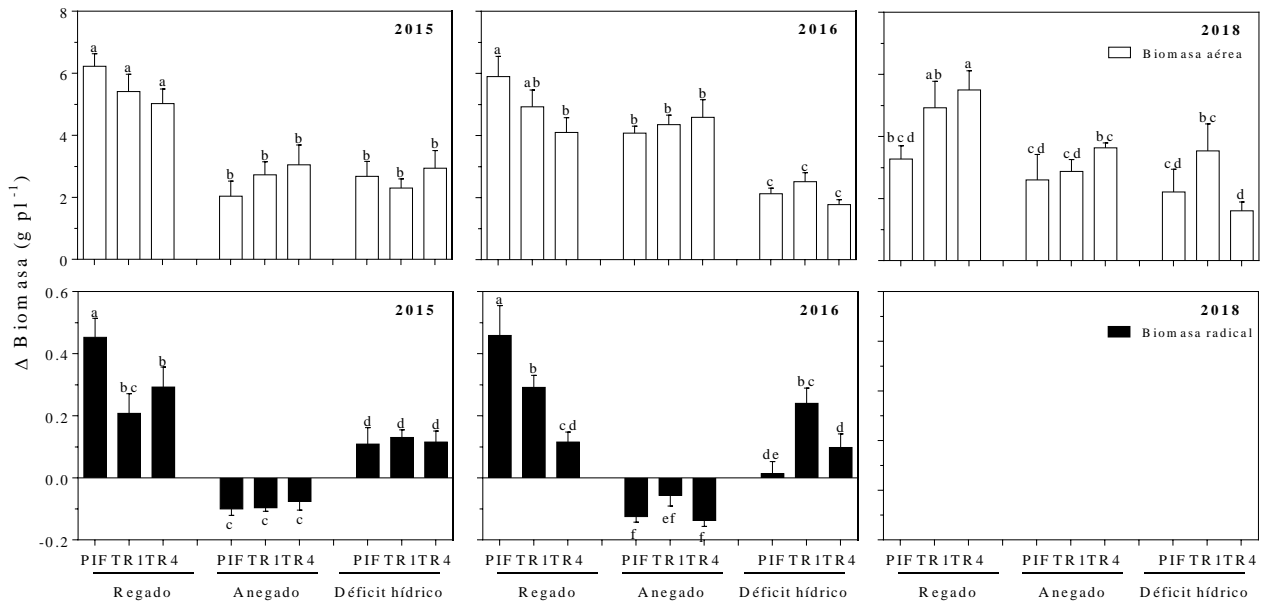


y sí disminuyó un 20% para el PIF y el TR1, mientras que en el año 2018 la biomasa aérea se redujo sólo un 8% en el genotipo TR4, pero dicha reducción fue de un 20% y un 27% para PIF y TR1, respectivamente ( $p \geq 0,05$ ; Figura 3.4).

La biomasa radical también se redujo a causa de ambos estreses. El anegamiento tuvo un efecto más marcado en la disminución de la biomasa radical que el déficit hídrico cuando se comparó respecto al tratamiento control en ambos experimentos (particularmente en 2016). La biomasa radical entre genotipos no mostró diferencias dentro de un mismo tratamiento y experimento. A pesar de ello, las reducciones de la biomasa radical tendieron a ser distintas ( $p \geq 0,05$ ). El TR4 en el experimento de anegamiento del 2015 redujo un 76% su biomasa radical, mientras que en el PIF y TR1 dicha reducción fue de un 81% comparada con el tratamiento control. En el año 2016 la reducción de la biomasa radical fue de 75%, 69% y 72% para PIF, TR1 y TR4, respectivamente en una condición de anegamiento respecto del control. Cuando el estrés hídrico estuvo dado por un déficit, la pérdida de biomasa radical respecto del tratamiento control fue de 34% para TR1, 43% para TR4 y 45% para PIF en el año 2015, y de 27% para TR4, 29% para TR1 y 40% para PIF en el año 2016.

Con la finalidad de analizar la magnitud de las reducciones en la biomasa aérea y radical por planta, se realizó la diferencia de la biomasa acumulada al momento de inicio y finalización de los tratamientos de condición hídrica que generaban estrés por exceso o por déficit. Se observaron reducciones en la biomasa aérea por planta, pero sin llegar a presentarse valores negativos, es decir la pérdida de biomasa aérea no llegó a disminuir por debajo del valor inicial del tratamiento (Figura 3.5). Sin embargo, la biomasa radical presentó reducciones con valores negativos ante un estrés por anegamiento en todos los

genotipos evaluados. Por otro lado, ante un déficit hídrico si bien hubo reducciones en la biomasa radical estas no llegaron a tener valores negativos debido a que la magnitud de la reducción fue menor que la observada en la situación de anegamiento (Figura 3.5).



**Figura 3.5.** Diferencia entre la biomasa aérea y radical por planta entre los diez días de ocurrida la antesis (fin del estrés) y el estadio de segundo nudo visible (inicio de encañazón, previo al estrés hídrico) para PIF, TR1 y TR4 en los distintos tratamientos (Regado, Anegado y Déficit hídrico) para los experimentos 2015, 2016 y 2018 (no se realizó muestro de biomasa radical en el 2018). Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Las barras verticales indican los errores estándar.

Los resultados de la relación biomasa raíz: tallo a los 10 días de ocurrida la antesis (fin del estrés), en ambos años de experimentación (2015 y 2016), mostraron que con el estrés hídrico hubo una disminución en la proporción de biomasa radical más marcada que en la de biomasa aérea. El anegamiento fue la situación donde la disminución de la partición radical: aérea fue de mayor magnitud y significativa ( $p < 0,01$ ; Cuadro 3.6). La comparación entre genotipos no mostró diferencias estadísticamente significativas dentro de cada tratamiento. Sólo el TR1 tuvo una mayor relación biomasa radical: aérea en la

condición potencial (Regado) en el 2016, cuyo patrón no se mantuvo en el resto de los tratamientos.

**Cuadro 3.6.** Relación biomasa radical: aérea a los 10 días de ocurrida la antesis (fin del estrés) para las distintas condiciones hídricas y genotipos en los experimentos 2015 y 2016. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) por el Test LSD de Fischer.

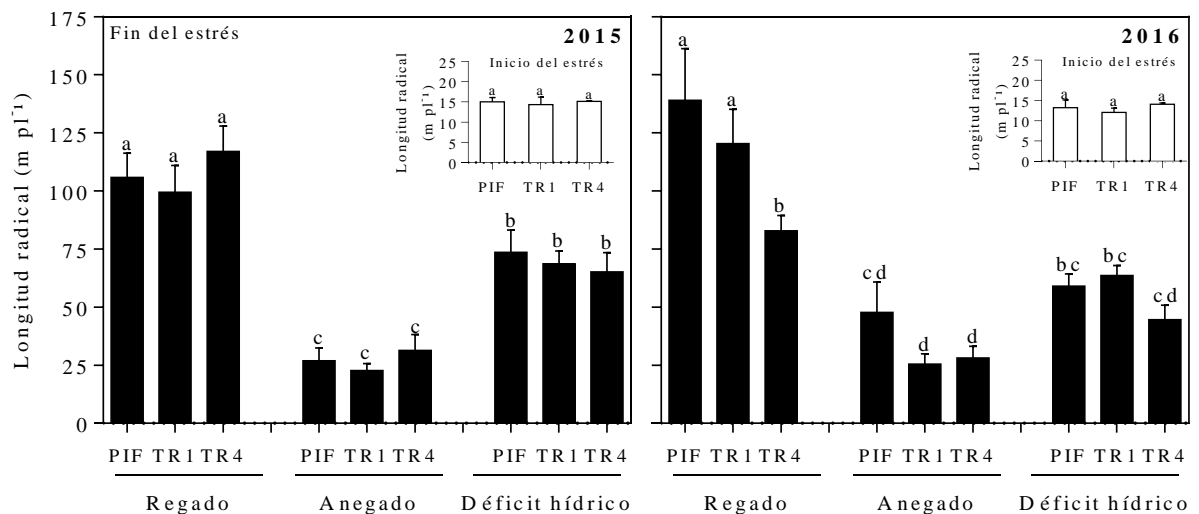
<b>Relación biomasa radical: aérea</b>			
Condición hídrica (CH)	Genotipo (G)	<b>2015</b>	<b>2016</b>
Control	PIF	0,09 <sup>a</sup>	0,10 <sup>b</sup>
	TR1	0,07 <sup>a</sup>	0,18 <sup>a</sup>
	TR4	0,08 <sup>a</sup>	0,12 <sup>b</sup>
Anegado	PIF	0,03 <sup>b</sup>	0,03 <sup>c</sup>
	TR1	0,02 <sup>b</sup>	0,04 <sup>c</sup>
	TR4	0,04 <sup>b</sup>	0,04 <sup>c</sup>
Déficit hídrico	PIF	0,09 <sup>a</sup>	0,07 <sup>bc</sup>
	TR1	0,09 <sup>a</sup>	0,11 <sup>b</sup>
	TR4	0,07 <sup>a</sup>	0,10 <sup>b</sup>
G		ns	ns
CH		**	**
G×CH		ns	ns

ns=diferencias no significativas; ns  $p \geq 0,05$ ; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

Como complemento al análisis de la biomasa radical, se caracterizó el diámetro y la longitud total de raíces por planta en todas las condiciones hídricas de los experimentos en los que se hizo muestreo de raíces (experimentos 2015 y 2016). El diámetro promedio para todas las combinaciones de genotipo y condición hídrica fue al momento de inicio de encañazón de 0,2 mm sin presentar diferencias estadísticamente significativas ( $p \geq 0,05$ ) entre los genotipos evaluados. Tampoco se observaron diferencias significativas entre genotipos en la longitud de raíces por planta ( $m\ pl^{-1}$ ) al momento previo de iniciar los tratamientos de estrés hídrico, en concordancia con el resultado obtenido con el peso de la biomasa radical. La longitud radical se vio afectada al finalizar los tratamientos hídricos

impuestos ( $p < 0,05$ ), donde el anegamiento generó una reducción de la longitud radical más marcada que el déficit hídrico (Figura 3.6).

Esta reducción en la longitud radical por el estrés hídrico respecto al control (Regado) fue del 75% en anegamiento y del 35% en déficit hídrico en el experimento del 2015. En el experimento del 2016, la reducción en la longitud radical fue del 60% y 50% para anegamiento y déficit hídrico, respectivamente. Sin embargo, no se generaron cambios el diámetro promedio de las raíces, manteniéndose en 0,2 mm ( $p \geq 0,05$ ).



**Figura 3.6.** Longitud radical por planta en el estadio de segundo nudo visible (previo al estrés hídrico; columnas blancas, Inicio) y a los diez días de ocurrida la antesis (fin del estrés hídrico; columnas negras, Final) para PIF, TR1 y TR4 en los distintos tratamientos (Regado, Anegado y Déficit hídrico) para los experimentos 2015y 2016. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Las barras verticales indican los errores estándar.

### 3.3.4 Biomasa aérea y partición a cosecha

El estrés hídrico, ya sea por anegamiento o por déficit hídrico, disminuyó de manera significativa la biomasa aérea total a madurez de las plantas respecto a la situación control en todos los experimentos, sin que se observaran diferencias significativas entre los genotipos (Cuadro 3.7).

**Cuadro 3.7.** Biomasa aérea total (g pl<sup>-1</sup>) e índice de cosecha para las distintas condiciones hídricas y genotipos en los experimentos 2015, 2016 y 2018 al final del ciclo del cultivo. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) por el Test LSD de Fischer.

Condición hídrica (CH)	Genotipo (G)	Biomasa aérea total (g pl <sup>-1</sup> )			Índice de cosecha		
		2015	2016	2018	2015	2016	2018
Control	PIF	12,10 <sup>a</sup>	12,14 <sup>a</sup>	10,56 <sup>a</sup>	0,51 <sup>a</sup>	0,48 <sup>ab</sup>	0,44 <sup>a</sup>
	TR1	11,15 <sup>a</sup>	11,72 <sup>a</sup>	10,41 <sup>a</sup>	0,53 <sup>a</sup>	0,51 <sup>a</sup>	0,39 <sup>ab</sup>
	TR4	12,50 <sup>a</sup>	9,82 <sup>b</sup>	9,44 <sup>ab</sup>	0,51 <sup>a</sup>	0,43 <sup>b</sup>	0,40 <sup>ab</sup>
Anegado	PIF	5,50 <sup>bc</sup>	4,83 <sup>cd</sup>	7,30 <sup>cd</sup>	0,28 <sup>c</sup>	0,15 <sup>d</sup>	0,38 <sup>bc</sup>
	TR1	4,30 <sup>c</sup>	5,16 <sup>c</sup>	7,43 <sup>cd</sup>	0,28 <sup>c</sup>	0,18 <sup>d</sup>	0,30 <sup>d</sup>
	TR4	6,55 <sup>b</sup>	5,15 <sup>c</sup>	8,10 <sup>bc</sup>	0,26 <sup>c</sup>	0,18 <sup>d</sup>	0,33 <sup>cd</sup>
Déficit hídrico	PIF	5,58 <sup>bc</sup>	3,85 <sup>d</sup>	6,39 <sup>d</sup>	0,38 <sup>b</sup>	0,30 <sup>c</sup>	0,38 <sup>bc</sup>
	TR1	5,64 <sup>bc</sup>	4,09 <sup>cd</sup>	7,64 <sup>cd</sup>	0,46 <sup>a</sup>	0,30 <sup>c</sup>	0,38 <sup>bc</sup>
	TR4	4,49 <sup>c</sup>	3,85 <sup>d</sup>	6,76 <sup>cd</sup>	0,38 <sup>b</sup>	0,20 <sup>c</sup>	0,36 <sup>bc</sup>
G		ns	ns	ns	ns	*	*
CH		**	**	**	**	**	**
G×CH		*	*	ns	ns	ns	ns

ns=diferencias no significativas; ns  $p \geq 0,05$ ; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

Tanto en los tratamientos de anegamiento como de déficit hídrico la biomasa aérea fue reducida en ca. 50%, no observándose diferencias significativas entre los genotipos en ninguno de los tres años experimentales evaluados. Con excepción del año 2018 en el que no se registró interacción G×CH, en los dos años anteriores se observó para la biomasa aérea interacción G×CH dado que el evento TR4 que disminuyó significativamente la biomasa en la condición control y el evento TR1 en la condición con déficit hídrico. Los tratamientos de anegamiento y déficit hídrico disminuyeron, a su vez, la partición de biomasa hacia los granos. El IC en las condiciones de anegamiento fue afectado

negativamente en mayor magnitud que el déficit hídrico para el año 2015 y 2016 ( $p < 0,01$ ; Cuadro 3.7). Las diferencias en IC entre genotipos no fueron consistentes entre años (Cuadro 3.7).

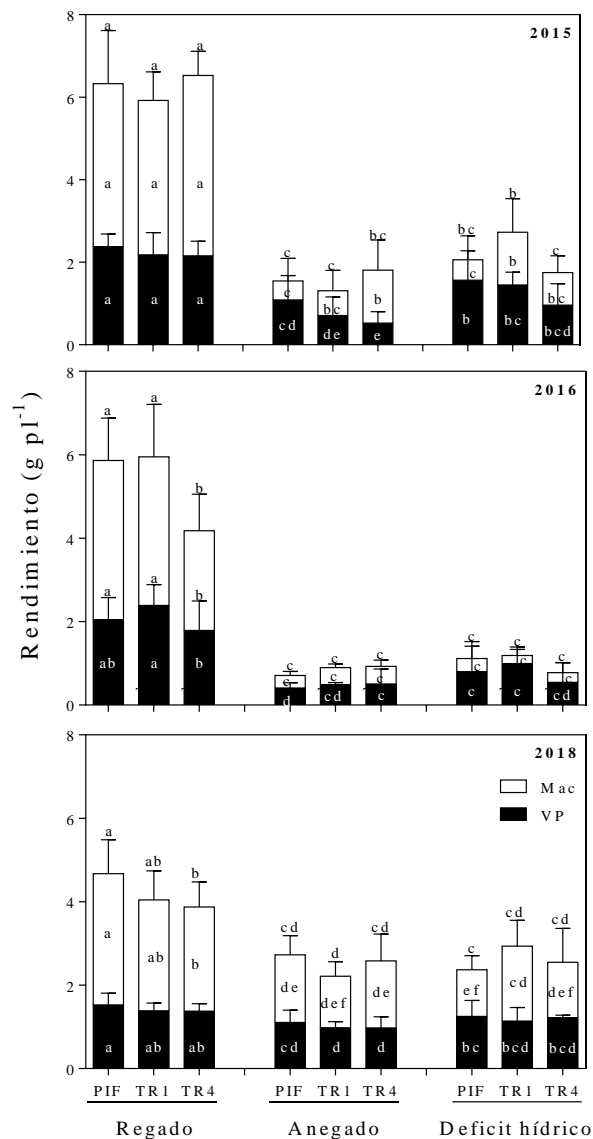
### 3.3.5 Rendimiento y sus componentes numéricos

Los tratamientos de exceso y de estrés hídrico redujeron el rendimiento respecto del tratamiento control un 65%, en promedio de los tres años experimentales (Figura 3.7). A su vez, ambas condiciones de estrés redujeron el rendimiento de los estratos de vástagos principales y de macollos, aunque el estrato más afectado en términos absolutos y proporcionales fue el estrato de macollos. La reducción del rendimiento de cada estrato en promedio fue de 45% para el vástago principal y del 72% para los macollos para los tratamientos de estrés hídrico respecto del control. En relación a la respuesta de los genotipos, en todos experimentos el rendimiento del cultivar PIF y el de los transgénicos  $PSARK::IPT$  (evento TR1 y evento TR4) estuvo afectado significativamente por el evento de estrés por anegamiento o por déficit hídrico ( $p < 0,001$ ), pero con distinta magnitud entre genotipos. En el tratamiento Regado, el rendimiento por planta ( $g\ pl^{-1}$ ) de PIF y TR1 no presentó diferencias significativas entre sí en los diferentes años de experimento ( $p \geq 0,05$ ; Figura 3.7). Sin embargo, el genotipo TR4 mostró para la condición control una penalización en el rendimiento en dos (2016 y 2018) de los tres años analizados cuando se comparó con PIF y TR1 (Figura 3.8).

En el tratamiento de anegamiento, donde el impacto negativo de la reducción en el rendimiento fue mayor que en déficit hídrico, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p \geq 0,05$ ) en el rendimiento por planta entre los distintos genotipos en los diferentes años. Sin embargo, se observó una leve tendencia a una menor penalización en el

genotipo TR4 en relación con el TR1 y el PIF cuando se comparó con el tratamiento control (Figura 3.7).

Cuando los genotipos fueron sometidos a déficit hídrico ninguno de los eventos transgénicos TR1 y TR4 mostraron ventajas respecto del PIF. Más aún, el genotipo TR4 fue el que mostró la mayor penalización ante la restricción hídrica (Figura 3.7).



**Figura 3.7.** Rendimiento en granos por planta ( $\text{g pl}^{-1}$ ) para PIF, TR1 y TR4 en los distintos tratamientos (Regado, Anegado y Déficit hídrico) para los experimentos 2015, 2016 y 2018. Barras llenas indican el rendimiento del vástago principal (VP) y las barras vacías al de macollos (Mac). Letras diferentes sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). Las barras verticales indican los errores estándar.

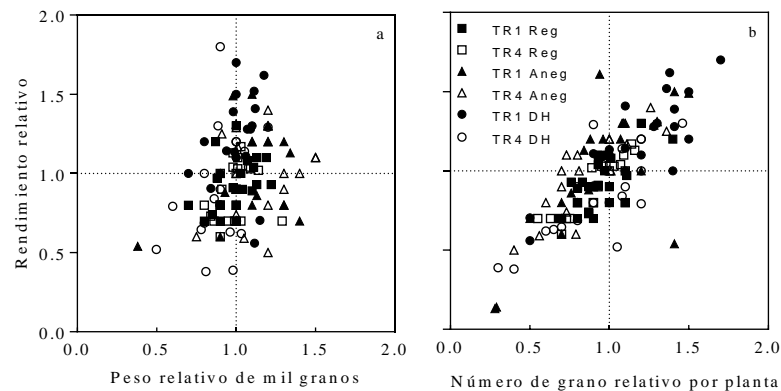
La respuesta de los distintos genotipos en relación con la contribución de los estratos de vástago principal y macollos mostró que, entre años experimentales y entre genotipos, en el caso del tratamiento Anegado, los genotipos TR1 y TR4 tendieron a sostener un mayor aporte de macollos respecto del PIF (las diferencias sólo fueron significativas en el año



2015). En el tratamiento Déficit hídrico no se observó una consistencia en el aporte de cada uno de los estratos en los genotipos transgénicos cuando se compararon con el PIF (Figura 3.7).

### 3.3.5.1 Respuesta de las plantas en el número y peso de los granos

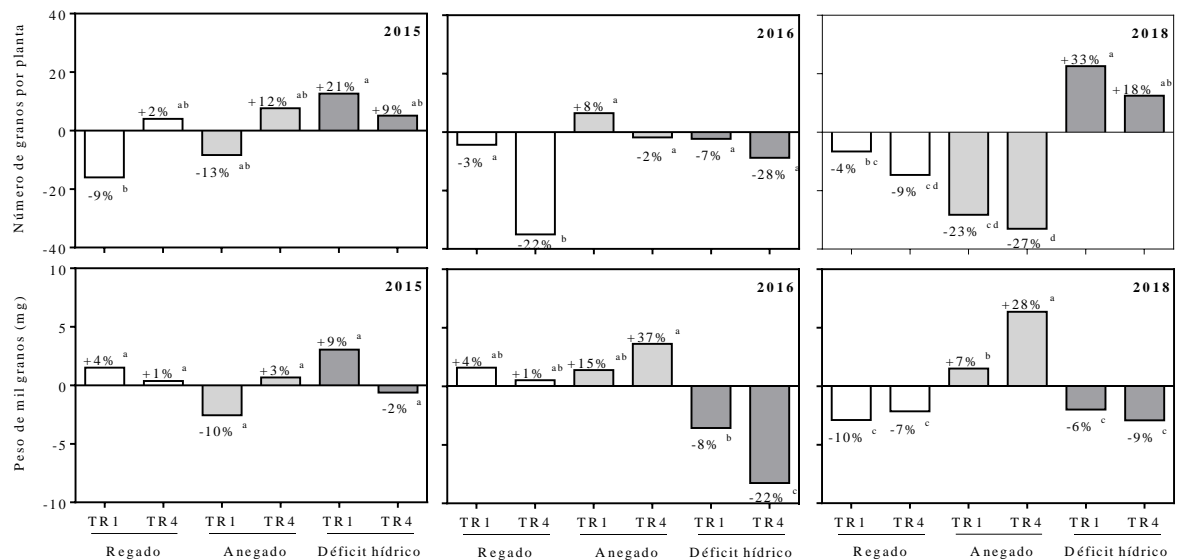
Considerando los dos principales componentes del rendimiento (i.e. número de granos  $\text{pl}^{-1}$  y peso de los granos), las variaciones en el rendimiento fueron explicadas por los cambios en el número de granos  $\text{pl}^{-1}$  (Figura 3.8).



**Figura 3.8.** Relación entre el rendimiento relativo de granos y peso relativo de mil granos (a) y número relativo de granos por planta (b) para TR1 y TR4 respecto a PIF en la condición hídrica Regado (Reg), Anegado (Aneg) y Déficit hídrico (DH) para todos los años de experimentos (2015, 2016 y 2018) en conjunto.

La exposición de las plantas a los estreses por exceso y por deficiencia hídrica mostró similar tendencia en el número de granos por planta que la observada para rendimiento. Así, el número de granos por planta cuando los genotipos fueron sometidos a estreses se redujo significativamente respecto del PIF (Figura 3.8 b).

El análisis de la respuesta de los transgénicos respecto al PIF (control) mostró que el cambio en el número de granos por planta de los genotipos dentro de una misma condición hídrica no fue consistente en los tres años de experimentos (Figura 3.9).



**Figura 3.9.** Cambios en el número de granos y peso de mil granos por planta para TR1 y TR4 respecto de PIF para la condición hídrica Regado, Anegado y Déficit hídrico para todos los años de experimentos (2015, 2016 y 2018). Las columnas representan los valores absolutos (media  $\pm$  error estándar), los valores sobre cada columna indican el porcentaje respecto a la condición control (PIF) y las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

En la condición potencial (Regado) el TR1 redujo entre 3 y 9% el número de granos por planta respecto de PIF en los tres experimentos. En el caso de TR4 en la misma condición varió su respuesta entre los años, con un aumento del 2% en el 2015 y caídas del 9 y 22% en el 2016 y 2018 respectivamente.

Cuando transcurrió un estrés hídrico, ya sea por exceso o por defecto, las respuestas de los transgénicos respecto de PIF variaron entre años. Cuando los materiales fueron expuestos a un déficit hídrico se observó un comportamiento similar entre los genotipos TR, donde ambos transgénicos sostuvieron el número de granos por planta por encima del PIF. Estas diferencias fueron para TR1 con un 21% en el 2015 y 33% en el 2018 y para TR4 con 9 y 18% en el 2015 y 2018 respectivamente (Figura 3.9). Con anegamiento las

variaciones en el número de granos por planta variaron respecto a PIF entre -23% y 8% en TR1 dependiendo del año y entre -27% a 12% para TR4 (Figura 3.9).

En cuanto al peso de los granos, en la condición control los transgénicos mostraron leves incrementos comparado con el PIF en dos de los años evaluados (4% TR1 y 1% TR4 para el experimento del 2015 y 2016, respectivamente), pero en el año 2018 el peso fue reducido respecto del PIF. Ante un anegamiento, los genotipos transgénicos aumentaron el peso de los granos en la mayoría de los años respecto del PIF. El TR1 aumentó un 15 y 7% respecto de PIF, mientras que el TR4 incrementó el peso de los granos 37% y 28% en los años 2016 y 2018 (Figura 3.10).

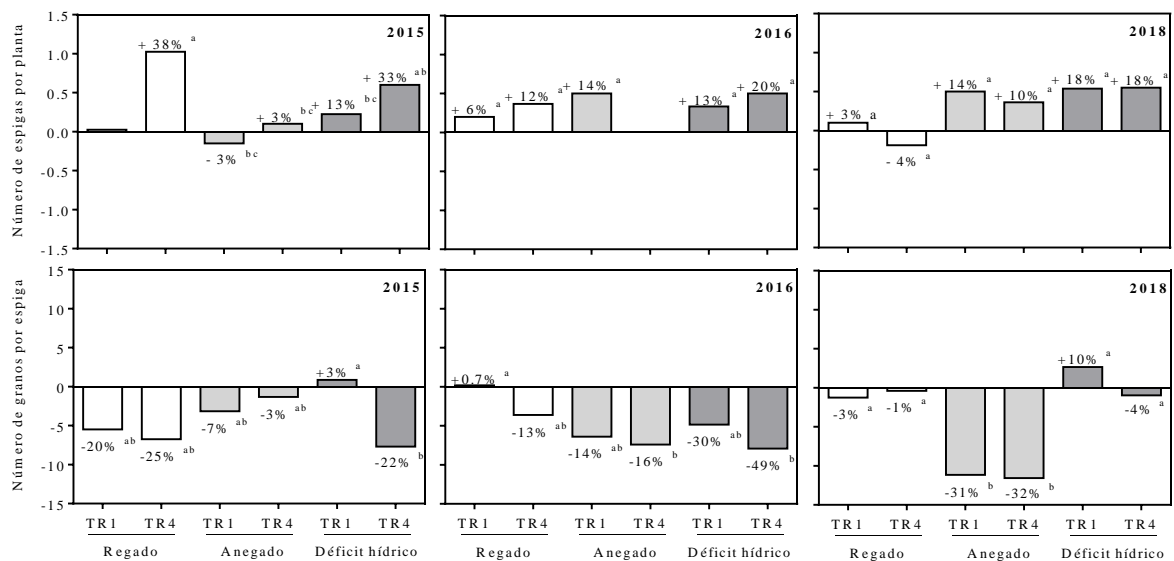
### *3.3.5.2 Variaciones en los sub-componentes que conforman el número de granos por planta: número de espigas por planta y número de granos por espiga*

La desagregación del número de granos por plantas en sus dos componentes (granos por espiga y espigas por planta) mostró respuestas variables dependiendo del tratamiento y el genotipo.

Los cambios relativos del número de espigas de las plantas transgénicas P<sub>SARK</sub>::IPT respecto al PIF mostraron en general valores positivos (Figura 3.11), en condiciones potenciales. Bajo la condición de anegamiento la respuesta del TR1 en el número de espigas por planta fue positiva en dos de los experimentos (2016 y 2018), con 14% de aumento respecto del PIF. Bajo la condición de déficit hídrico el genotipo TR1 mostró un aumento consistente en el número de espigas por planta, siendo un 13% en el experimento 2015 y 2016 y de un 18% en el 2018 (Figura 3.11).

El TR4 presentó un mayor valor del número de espigas por planta en la condición Regado cuando se lo comparó con el PIF con un 38% y 12% más en los experimentos 2015

y 2016, respectivamente. Ante un exceso hídrico, las variaciones relativas de este genotipo fueron muy pocas cuando se los comparó con el PIF ya que sólo en el último año (experimento 2018) el incremento fue de 10%. A diferencia de lo observado en el exceso hídrico, ante un déficit hídrico el genotipo TR4 tuvo un marcado aumento en el número de espigas en los tres años de experimentos (33%, 20% y 18% en los experimentos 2015, 2016 y 2018; respectivamente) (Figura 3.11).



**Figura 3.10.** Cambio del número de espigas por planta (paneles superiores) y número de granos por espiga (paneles inferiores) para TR1 y TR4 respecto de PIF dentro de la condición hídrica Regado, Anegado y Déficit hídrico para todos los años de experimentos (2015, 2016 y 2018). Las columnas representan los valores absolutos (media  $\pm$  error estándar), los valores sobre cada columna indican el porcentaje respecto a la condición control (PIF) y las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Contrariamente a lo ocurrido con el número de espigas, el número de granos por espiga respondió negativamente en la mayoría de los ambientes. El TR1 no mostró variaciones respecto al PIF ante exposiciones a estreses hídricos ya sea por exceso o por defecto; sin embargo, en la condición control el número de granos por espiga fue reducido en ca. 20% respecto del PIF. En la condición de anegamiento el TR1 mostró una clara reducción en los tres años experimentales de entre 7 a 31% cuando fue comparado con el PIF (Figura 3.11).

Similar tendencia mostró el genotipo TR4 bajo la condición de anegamiento. Ambos genotipos transgénicos si bien no registraron un patrón consistente bajo la condición de déficit hídrico, en general (como promedio) mostraron reducciones respecto del PIF, especialmente el genotipo TR4 (Figura 3.11).

### **3.4 Discusión**

En este capítulo se evaluó el comportamiento fenotípico de plantas de trigo transgénico  $P_{SARK::IPT}$  y se compararon con su control (*cv.* ProINTA Federal, PIF). Los resultados demostraron que las plantas que contenían el transgén  $P_{SARK::IPT}$  en su genoma presentaron un comportamiento fenológico similar al PIF sin mostrar anomalías en su fenotipo independientemente de la condición ambiental. Como estrategia para evaluar si el transgén  $P_{SARK::IPT}$  en plantas de trigo genera una tolerancia al estrés hídrico, se las expuso a condiciones hídricas contrastantes y su respuesta fue explicada a través del rendimiento en granos y biomasa total. Dichas respuestas se discuten en los siguientes párrafos.

El estrés hídrico generado tanto por exceso como por déficit aplicados durante el “periodo crítico de generación de rendimiento” en las plantas transgénicas  $P_{SARK::IPT}$  y el PIF tuvo un efecto negativo y significativo en el rendimiento en todos los experimentos produciendo una reducción en promedio de ca. 65% del rendimiento en grano respecto a una condición potencial. En la bibliografía se describen reducciones entre 38-92% en el rendimiento como consecuencia de anegamientos aplicados durante el periodo crítico (Belford, 1981; Hossain et al., 2011; Yavas et al., 2012; San Celedonio et al., 2014; Marti et al., 2015) y penalizaciones entre 11-51% debido a déficit hídricos durante el mismo periodo (Gupta et al., 2001; Majid et al., 2007; Jatoi et al., 2011). Los resultados de la presente tesis muestran reducciones en rendimiento aún mayores que las descritas en la literatura, sobre

todo comparado con el tratamiento de déficit hídrico. El estrés hídrico afectó de manera diferente la contribución de los distintos estratos al rendimiento causando una reducción en el rendimiento de un 45% en el vástago principal y un 72% en los macollos. Estos resultados están en línea con otras evidencias de la literatura que demuestran que el estrato más sensible a los estreses tanto por déficit como por exceso de agua son los macollos. de San Celedonio et al. (2014) mostraron que con un evento de anegamiento en el período crítico el rendimiento se redujo un 64% en el vástago principal y un 82% en los macollos .

Bajo condiciones potenciales, el rendimiento para PIF y el TR1 fue similar, en cambio el TR4 mostró una penalización en este atributo en dos de los tres experimentos realizados. Similares respuestas se observaron cuando el tratamiento impuesto fue un déficit hídrico. Cuando la condición de estrés era por anegamiento, el TR4 fue el genotipo que tuvo una leve tendencia positiva a mantener el rendimiento respecto a PIF y TR1. En ningún caso se observó que las plantas transgénicas  $P_{SARK::IPT}$  tuvieran un rendimiento en grano estadísticamente diferente respecto del genotipo control (PIF) lo que contrasta con lo descrito en la bibliografía (Rivero et al., 2007; Rivero et al., 2009; Peleg et al., 2011; Qin et al., 2011; Oneto et al., 2016). En este sentido, evidencias en genotipos de arroz conteniendo el transgén  $P_{SARK::IPT}$  en su genoma mostraron una ventaja significativa en el rendimiento en grano por planta respecto a su control ante un déficit hídrico impuesto entre 6 y 10 días alrededor de floración (Peleg et al., 2011). En maíz, plantas que contenían el transgén  $P_{SARK::IPT}$  mostraron una ventaja sobre el control cuando fueron sometidas a déficit hídrico durante 20 días alrededor de la floración (Oneto et al., 2016).

Al igual que lo mostrado en numerosas evidencias de la bibliografía para trigo, el componente principal que determinó las pérdidas de rendimiento por estrés hídrico en los

trigos transgénicos P<sub>SARK::IPT</sub> fue el número de granos (Robertson et al. 2009; Ji et al., 2010; de San Celedonio et al. 2014; Farooq et al., 2014; Marti et al., 2015). Sin embargo, y a pesar de no observarse diferencias significativas en el rendimiento, los genotipos transgénicos demostraron una mayor capacidad en tolerar el estrés por déficit o por exceso hídrico en el atributo número de granos, aunque en cada tipo de estrés no hubo consistencia en cual fue el evento transgénico que resultó más favorable. En este sentido, cuando la condición hídrica era desfavorable dada por anegamiento, en general el evento transgénico TR4 mostró una leve tendencia a mantener el número de granos, mientras que el evento transgénico TR1 a disminuirlos respecto al genotipo control. En cambio, cuando estuvieron expuestos a un déficit hídrico ambos eventos transgénicos tendieron a incrementar el número de granos respecto al PIF siendo en TR1 el efecto de mayor magnitud (ca. 21-33%) que en TR4 (ca. 9%-18%). A pesar de que se observó un incremento del número de granos en las plantas de los eventos transgénicos comparado a su control ante un déficit hídrico, esta ventaja fue contrabalanceada por un menor peso de granos promedio respecto a PIF. En la condición hídrica potencial y en el anegamiento ambos eventos transgénicos generaron un peso promedio igual o mayor comparado al PIF. En el caso del anegamiento, el peso de los granos tuvo incrementos que fueron observados tanto por el evento TR1 (ca. 11%) y el TR4 (ca. 38%) respecto a PIF. Estas respuestas muestran controversias con la literatura donde se indica que ante un déficit o un exceso hídrico hay una penalización en el peso de los granos (Belford et al., 1981; Ji et al., 2010; San Celedonio et al. 2014). Sin bien la disminución del peso de los granos ante un déficit hídrico en los eventos transgénicos va en contexto con la literatura, cuando se trata de un

exceso hídrico la respuesta fue inversa, observándose incrementos en el peso de los granos para uno de los eventos transgénicos (TR4).

Las respuestas en número y peso de los granos indicarían que hay un efecto de compensación entre ambos atributos que hace que no se observen diferencias en el rendimiento final cuando se lo compara con el rendimiento del PIF. Distintos trabajos en la bibliografía han informado que el peso de los granos tiene una relación negativa con el número de los granos (Miralles y Slafer, 1995; Slafer et al., 1996). Esta respuesta es posible dado que muchos germoplasmas de trigo tienen un control genético independiente para el número de granos y peso de estos, lo que permite que se pueda aumentar el número de granos, pero no sostener el peso de estos y viceversa (Farooq et al., 2014).

Un aspecto que puede estar relacionado a la compensación entre el número y peso de granos en los trigos transgénicos es el incremento del nivel de citoquininas en las plantas dado por el gen *ipt* (controlado por el promotor SARK que es inducible por estrés hídrico), ya que se ha demostrado que esta hormona controla las relaciones entre la fuente y los destinos de las plantas (Roitsch y Ehneb, 2000). En trigo, la fuente está dada por el suministro de asimilados provenientes de la fotosíntesis actual y por la actividad enzimática relacionada con la translocación de fotoasimilados hacia los granos (Grashoff y d'Antuono, 1997; Slafer et al., 2003; Serrago et al., 2011). Por el otro lado, los destinos están determinados por el número y tamaño de granos que finalmente conforman el rendimiento. Se podría sugerir que el aumento en el peso de los granos de los trigos transgénicos en anegamiento podría estar atribuido al aumento de los niveles de citoquininas que este generó en respuesta al estrés, dado que estos genotipos no muestran diferencias en la capacidad fotosintética respecto al genotipo control (datos no mostrados). En este sentido,



una mayor disponibilidad de recursos para las flores previo a antesis puede dar como resultado un aumento en el peso final de los granos (Calderini y Reynolds, 2000), dado que el peso de los carpelos en antesis tiene una relación directa con el tamaño final que presentarán los granos al condicionar su tamaño potencial (Calderini et al., 1999). Si bien en varios trabajos realizados en trigo sobre el impacto de las modificaciones en la relación fuente: destino indican que la planta de trigo presenta limitación por destino (Jenner, 1979; Borrás et al., 2004) o co-limitación fuente: destino (Acreche et al., 2009; Zhang et al., 2010). Estos trabajos han sido tradicionalmente realizados bajo condiciones potenciales, es decir en plantas creciendo sin limitaciones hídrico-nutricionales, y focalizándose su análisis en granos provenientes de espigas del vástago principal. Sin embargo, en el marco de esta tesis el trigo transgénico está expuesto a condiciones de estrés y no se está discriminando por estrato a los valores de número de granos y peso.

Evidencias en arroz transgénicos  $P_{SARK::IPT}$  mostraron que incrementos en el nivel de citoquininas, pudieron mantener la funcionalidad sobre todo de la hoja bandera a través de una regulación del metabolismo del carbono y el nitrógeno. Esto permitió mantener la actividad fotosintética y la asimilación de nitratos durante el déficit hídrico. Las plantas de arroz transgénico  $P_{SARK::IPT}$  en condiciones de estrés hídrico no difirieron en el número de macollos, altura de la planta y momento de floración, sólo en una mayor biomasa seca a cosecha por lo que la diferencia en el rendimiento de granos estuvo atribuido a los cambios en la relación fuente: destino (Peleg et al., 2011; Reguera et al., 2013). Los resultados de la presente tesis demostraron que los trigos transgénicos  $P_{SARK::IPT}$ , a pesar que la biomasa generada a cosecha no determinó diferencias estadísticamente significativas con el PIF, tendieron a mantener la biomasa aérea comparado al genotipo control cuando pasaron de

una condición hídrica de riego a una de estrés hídrico. Aunque no observaron retrasos en la senescencia en los trigos transgénicos P<sub>SARK::IPT</sub> comparada a PIF se podría sugerir otro mecanismo involucrado como por ejemplo una mejora en la actividad fotosintética por unidad de área de hoja ante condiciones de estrés. Los que han estudiado los mecanismos fisiológicos en plantas transgénicas P<sub>SARK::IPT</sub> muestran una fuerte correlación del transgén con mejoras en la actividad fotosintética y en la eficiencia de uso del agua, en base a ello se podría especular que los trigos transgénicos mantienen mejor estos mecanismos fisiológicos respecto al genotipo control (Rivero et al., 2007; 2009; Peleg et al., 2011; Reguera et al., 2013; Oneto et al., 2016), pero ello no se evidenció plenamente en los presentes resultados.

Otro efecto de compensación ocurrió con el número de espigas y el número de granos por espiga como respuesta de las plantas P<sub>SARK::IPT</sub> para todas las condiciones hídricas de todos los experimentos realizados. Los trigos transgénicos establecieron en todas las condiciones un mayor número de espigas por planta en relación con el PIF, debido posiblemente a una mayor expresión de citoquininas que promovieron un mayor macollaje o redujeron la tasa de mortandad de los macollos iniciados (Langer et al., 1973; Sharif y Dale et al., 1980; Suge y Iwamura, 1993). Evidencias en arroz demostraron que el número de espigas aumentó por el incremento de los niveles de citoquininas (Lin et al., 2002). Sin embargo, el número de granos establecidos por espiga fue menor al PIF en ambas condiciones de estrés hídrico. Estos resultados coinciden con la bibliografía, donde el número de grano por espiga también explica una proporción importante de la variación en el número de grano por planta en condiciones de anegamiento (Cannell et al. 1984; de San Celedonio et al., 2014). Los estreses por anegamiento como por déficit hídrico provocan reducciones en la fertilidad de las espiguillas, en forma análoga a los observado en los

trigos transgénicos P<sub>SARK</sub>::IPT en los cuales hubo un menor establecimiento de granos por espiga (Ji et al., 2010; San Celedonio et al., 2014). Esto puede ser como consecuencia del estrés hídrico, el cual genera una mala formación y desarrollo de los granos por la esterilidad del polen y embrionaria y en algunos casos causando el aborto de las flores (Barnabás et al., 2008; Farooq et al., 2014; Folsom et al., 2014; Begcy y Walia, 2015). El efecto de una mayor reducción del número de granos por espiga en los trigos transgénico puede ser debido a que se afectó la partición de los recursos hacia la espiga durante la última etapa de la encañazón o por un desajuste hormonal. Se ha demostrado en trigo que el aborto floral es consecuencia del incremento en la acumulación de ácido abscísico (ABA) en el ovario y anteras de las flores provocando una reducción en el número de flores fértiles lo que se traduce en un menor número de granos por espiga (Westgate et al., 1996). En plantas de maíz transgénicas P<sub>SARK</sub>::IPT que incrementaron su rendimiento se observó que presentaban niveles de ABA reducido por el incremento del nivel de citoquininas que genera la sobreexpresión de el gen *ipt*. En base a esto se indica que la reducción del ABA en los órganos reproductivos puede ser atribuible al aumento del número de flores y reducción del aborto de granos por espiga (Oneto et al., 2016). Sin embargo en las plantas de trigo P<sub>SARK</sub>::IPT, utilizadas en esta tesis no se observó un incremento o sostenimiento de granos por espiga respecto a las plantas control por lo que se puede especular que: (i) las ventajas que genera el gen *ipt* sobre la disminución del contenido de ABA en los órganos florales no estaría ocurriendo por la ubicación de la espiga dentro de la planta, y/o (ii) que los niveles de citoquininas que presentan los trigos transgénicos P<sub>SARK</sub>::IPT en la espiga no pueden contrarrestar los efectos del ABA. En tabaco y arroz transgénico P<sub>SARK</sub>::IPT se ha mostrado claras evidencias que el nivel de expresión del transgén difiere en los distintos

órganos de la planta y se ha mantenido alta su expresión en los tejidos senescentes o más basales (ceranos a la raíz) y disminuido en los que crecen activamente como hojas nueva y yemas apicales (Mok y Mok, 2001; Sakakibara, 2006; Rivero et al., 2007; 2009; Peleg et al., 2011)

Hasta aquí se ha demostrado que los trigos transgénicos P<sub>SARK</sub>:IPT en relación al PIF (genotipo control) no manifestaron efectos contraproducentes atribuibles al transgén P<sub>SARK</sub>:IPT. Se pudo observar que los distintos eventos transgénicos (TR1 y TR4) manifestaron respuestas muy variables entre sí, lo cual es esperable porque son líneas independientes de transformación, pero también manifestaron variabilidad en su comportamiento en cada experimento y entre las plantas del mismo evento en sí. La variación entre las líneas transformadas podría deberse a los efectos de posición de las inserciones P<sub>SARK</sub>:IPT, dado que la ubicación genómica indeterminada puede estar causando variaciones en la expresión génica (Xu, 2010). Estas variaciones pueden ser independientes de cada planta a cómo responde al ambiente (inclusive dentro del mismo evento transgénico) generando posibles silenciamientos en la transcripción del transgén dado por el alto número de inserciones dentro del genoma. La posibilidad del silenciamiento génico generado por la presencia de un alto número de mensajeros ha sido señalada por varios autores (Van der Krol et al., 1990; Hobbs et al., 1993; Kohli et al., 2003; Baulcombe, 2004) y es rutinariamente observada en especies poliploides como el trigo y también en eventos transgénicos generado por biolística (Bhalla, 2006). Asimismo, la variación observada entre los eventos también podría deberse a que ambos disponen de diferente número de inserciones del transgén: el evento TR1 contiene dos inserciones y el evento TR4 contiene diez sitios de inserción del transgén (A. Bezec, comunicación

personal, <beznec.ailin@inta.gob.ar>). Es importante mencionar que se desconoce cuántas de esas inserciones son transcripcionalmente activas. Sumado a ello, el gen *ipt* está controlado por un promotor que es inducible al estrés hídrico por lo que las respuestas están dadas por interacción con el ambiente. Una selección de plantas con la mejor performance posiblemente podría estar eliminando parte de estas variaciones y mantener genotipos más estables.

## CAPÍTULO 4

---

### **RENDIMIENTO DE PLANTAS TRANSGÉNICAS $P_{SARK::IPT}$ EN CONDICIONES HÍDRICAS RESTRICTIVAS BAJO CONDICIONES DE CAMPO**

#### **4.1 Introducción**

Los cultivos en general, y los invernales en particular, están expuestos bajo condiciones de campo y en los sistemas de producción de secano a períodos de estrés hídrico tanto por déficit como por exceso en diferentes momentos del ciclo, originados por la magnitud y distribución de las precipitaciones, afectando negativamente el rendimiento (Magrín, 1990; Savin et al., 1995; Abbate et al., 2001; Brisson et al., 2001; Collaku y Harrison, 2002; Andrade y Satorre, 2015). A lo largo de la historia se han desarrollado distintas estrategias para reducir las pérdidas de rendimientos de los cultivos y generar una mejor adaptación ante estos eventos de estreses abióticos (Catetivelli et al., 2008), por ejemplo ajustar la fenología del cultivo como estrategia para escapar a la ocurrencia de estrés por deficiencia hídrica (Slafer et al., 2003). Más recientemente se ha utilizado como opción la transgénesis la cual provee una respuesta prometedora para mitigar los efectos negativos del estrés hídrico. Para generar líneas transgénicas en trigo la vía más exitosa ha sido el método biolístico a través del cual se realiza la inserción de ADN dentro del genoma de la célula vegetal (Vasil et al., 1992; Vasil et al., 1993; Semanas et al., 1993; Nehra et al., 1994; Zhou et al., 1995; Alpeter et al., 1996; Ortiz et al., 1996; Takumi et al., 1996; Barro et al., 1998; Yao et al., 2006; Kovalchuk et al., 2009; Ismagul et al., 2014; Zhang et al., 2014). Si bien el

método biolístico es una herramienta útil para la incorporación del ADN foráneo, su aplicación puede resultar en la inserción de múltiples copias de manera indiscriminada no siendo este aspecto deseable (Sparks y Jones, 2004). Un alto número de inserciones es común en cereales con esta técnica pero ello puede conducir al silenciamiento transgénico, la expresión transgénica aberrante en las generaciones posteriores e incluso la pérdida de los transgenes (Van der Krol et al., 1990; Hobbs et al., 1993; Srivastava et al., 1996; Stoger et al., 1998; Kohli et al., 1999; Pellegrineschi et al., 2002; Kohli et al., 2003; Baulcombe, 2004; Sparks y Jones, 2004; Agrawal et al., 2005; Jones, 2015). Las plantas transgénicas con insertos de copia única o con bajo número de copias se ven menos afectadas por estos problemas, y por lo tanto son deseables para estudios genómicos funcionales o para la producción de plantas libres de marcadores después de la segregación genética (Jones, 2005, 2015). Los trigos transgénicos P<sub>SARK</sub>::IPT han sido obtenidos por el método biolístico y se conoce a través del patrón diferencial de bandas obtenido en un análisis de Southernblot que los eventos TR1 y TR4 poseen dos y diez inserciones del transgén P<sub>SARK</sub>::IPT, respectivamente. Estos valores se han mantenido constantes en las últimas tres generaciones estudiadas en la presente tesis (A. Beznec, comunicación personal, <beznec.ailin@inta.gob.ar>).

En el caso del evento TR1, este mantiene la expresión del transgén de manera constante ya sea en condiciones de riego normal como con déficit hídrico. Una situación distinta se observó con el evento TR4, en el cual el transgén sólo es inducido por estrés hídrico. Esto podría deberse a la posición de integración del transgén que influenció la expresión, tal como fue descrito en otros trabajos (Kumar y Fladung, 2001; Kohli et al., 2003). Aunque su expresión pareciera corresponder a la de un gen transcripto bajo el control de un promotor

constitutivo, no hay efectos deletéreos producidos por la sobreexpresión de citoquininas en parámetros como el tiempo de floración y la arquitectura de la planta (Hewelt et al., 1994; Peleg y Blumwald, 2011; Beznec, 2017). De todas maneras, en la bibliografía se han observado cambios moleculares, morfológicos o fisiológicos producidos por mínimas modificaciones en los niveles de expresión generados por la inserción de transgénos en rutas metabólicas (Maloney et al., 2015), factores de transcripción (Hsieh et al., 2002; Dubouzet et al., 2003; Oh et al., 2005) o enzimas que limitan la producción de hormonas (Rupp et al., 1999; Gupta y Rashotte, 2012).

Otro punto importante a tener en cuenta es el ambiente donde son ejecutados los experimentos para caracterizar el comportamiento de las plantas. La mayoría de los trabajos en los que se han evaluado plantas transgénicas, incluyendo aquellas transformadas con el transgén  $P_{SARK}::IPT$ , se desarrollaron en condiciones controladas sobre todo cuando se trata de caracterizar un gen específico asociado a un carácter fisiológico (Earl, 2003; Rivero et al., 2007; Rivero et al., 2009; Peleg et al., 2011; Qin et al., 2011; Passioura 2012; Beznec et al., 2014; Oneto et al., 2016). Los ambientes controlados, ya sea invernáculos o cámara de cría, permiten monitorear la intensidad, frecuencia y uniformidad de los factores ambientales (luz, temperatura, humedad relativa del aire, humedad del suelo, disponibilidad de nutrientes). Si bien el ambiente controlado tiene estas ventajas, cabe mencionar que en condiciones a campo los experimentos presentan una caracterización fenotípica más cercana a la realidad, en cuanto al ecosistema donde crece el cultivo y la interacción con los factores ambientales. Por otra parte, en condiciones controladas, donde se utilizan plantas individuales, las respuestas de los tratamientos pueden no representar lo que ocurre cuando se trabaja a nivel de canopeo (Cox y Cochran, 1946; Pedró et al., 2012). La dificultad de



traducir los beneficios observados en ambientes controlados hacia condiciones de campo ha sido la principal dificultad para el éxito a nivel productivo de plantas transgénicas tolerantes al estrés hídrico (Passioura, 2012), más allá de las regulaciones de la actividad. Un claro ejemplo en este sentido se observó con el algodón transgénico P<sub>SARK::IPT</sub>, el cual mostró ventajas ante un déficit hídrico, comparado a su control en condiciones controladas de invernáculo, aunque dichas ventajas no continuaron cuando se lo llevó a condiciones de campo (Zhu et al., 2018). En base a estos estudios, a las distintas características moleculares de ambos eventos transgénicos P<sub>SARK::IPT</sub> y a la variabilidad en la performance entre las plantas dentro del mismo evento observado en el análisis del Capítulo 3 de la presente tesis, en este capítulo se realizó un *screening* para evaluar la performance de un promedio de 22 plantas de cada uno de los eventos transgénicos TR1 y TR4. A partir de la selección de plantas de mejor performance basada en la respuesta del rendimiento en granos de cada evento como resultado del *screening*, el objetivo del presente capítulo fue la evaluación de la producción de biomasa aérea y el rendimiento y sus componentes numéricos en plantas de trigo transformadas con el transgén P<sub>SARK::IPT</sub> las que fueron comparadas con plantas control frente a restricciones hídricas durante el periodo crítico del cultivo en situación de campo (Objetivo particular I y III).

## **4.2 Materiales y métodos**

### **4.2.1 Condiciones generales, diseño experimental y tratamientos**

Los experimentos que aborda este capítulo son los detallados en el Capítulo 2 referidos a la condición de campo. En resumen, se realizó un experimento en el año 2017 en la localidad de Bordenave y durante el 2018 se llevaron adelante experimentos a campo en Bordenave y en FAUBA. Los experimentos de Bordenave se sembraron el 18 de julio en el

2017 y el 12 de julio en el 2018, y el experimento de FAUBA se sembró el 16 de julio del 2018. El primer experimento (Bordenave 2017) se llevó a cabo a los fines de realizar un *screening* de la performance de líneas independientes dentro de cada evento transgénico y plantas segregantes no transgénicas (SNT). En base a la respuesta obtenida en este experimento se seleccionaron dos líneas de cada uno de los eventos TR1 y TR4, así como de las plantas SNT, tomando el criterio de las respuestas de los eventos en rendimiento ante las condiciones de baja oferta hídrica. Las semillas de estas líneas fueron sembradas en parcelas a campo en FAUBA y en la localidad de Bordenave en el año 2018 para determinar biomasa aérea, rendimiento y componentes numéricos por unidad de área.

#### **4.2.2 Mediciones y análisis**

##### *4.2.2.1 Mediciones realizadas*

En todos los experimentos una vez que el cultivo llegó a madurez de cosecha, se cosecharon las plantas correspondientes a una superficie de 0,1 m<sup>2</sup> y fueron llevadas a estufa a 60 °C hasta peso constante. Se determinó el peso seco de la planta entera (sólo en los experimentos de parcelas de FAUBA y Bordenave del año 2018), número de plantas y número de espigas. Luego se separó las espigas del resto de la biomasa y se trillaron para obtener el rendimiento, peso y número de granos. El IC se obtuvo como resultado de la relación entre el rendimiento de grano y la biomasa total aérea. Para determinar el valor del peso de mil granos, número de granos por unidad de área y número de granos por espiga se utilizó el peso seco individual del grano obtenido a través del peso de dos sub-muestras de 100 granos.

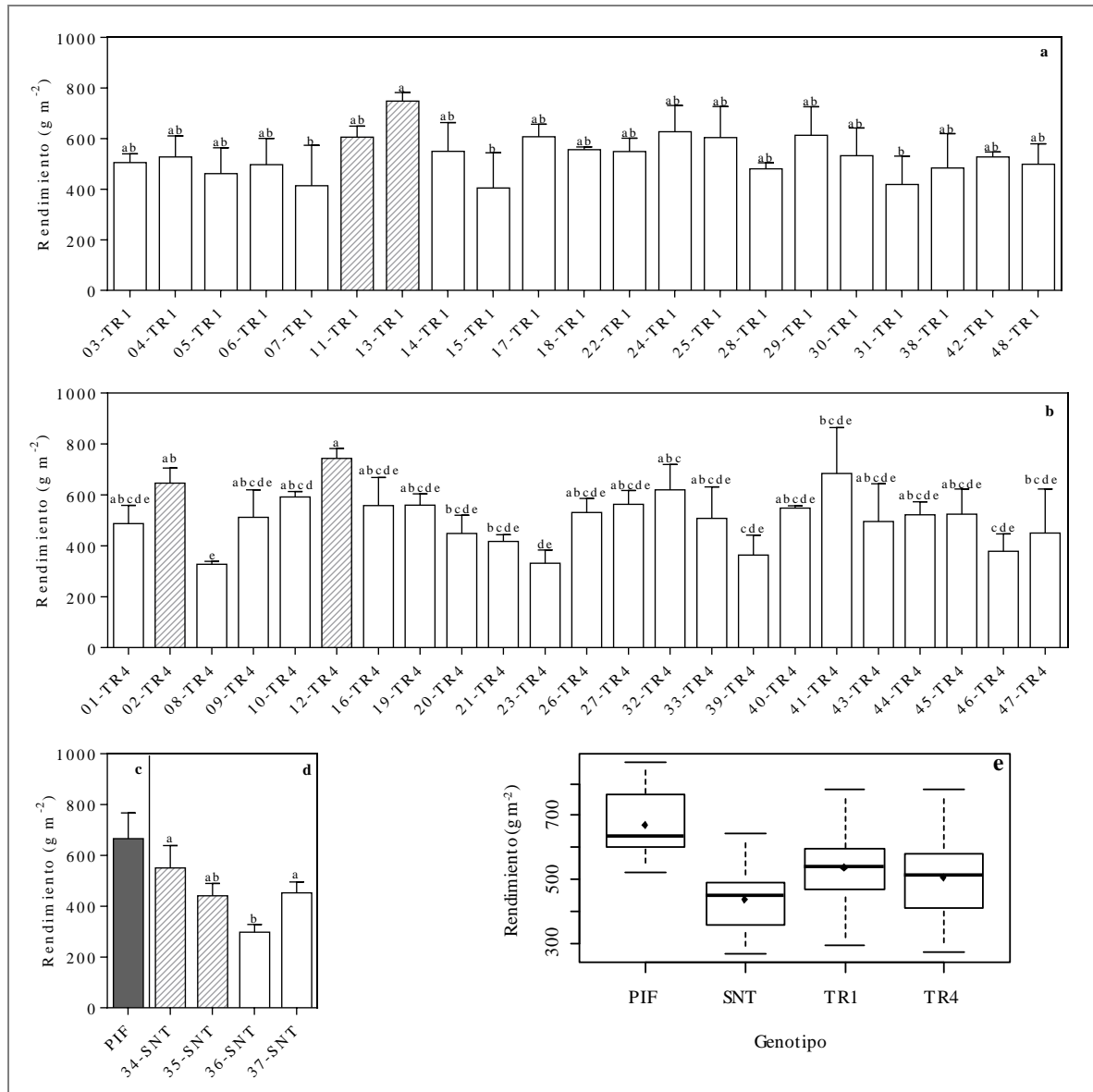
##### *4.2.2.2 Análisis estadístico de los datos*

Para el análisis de los datos se utilizó el programa de InfoStat Profesional v.1.1 (Di Renzo et al., 2011), el cual permitió realizar la prueba de diferencias estadísticas entre los tratamientos mediante el análisis de varianzas (ANVA). Las medias de los tratamientos se compararon con la Test LSD (Least significant difference) de Fisher con un nivel de significación de 0,05.

### **4.3 Resultados**

#### **4.3.1 Evaluación de líneas independientes de plantas de trigo P<sub>SARK</sub>::IPT a campo en condiciones de secano.**

Todos los genotipos mostraron un comportamiento fenotípico similar dentro de cada experimento con similar fenología. El rendimiento con las líneas TR1, TR4 y SNT evaluadas en Bordenave en 2017 mostró diferencias entre genotipos (Figura 4.1). De dicho ensayo se identificaron para cada evento las dos líneas con mayor rendimiento, para ser luego utilizadas en los experimentos a realizar en parcelas a campo. Para el evento TR1 las líneas que se seleccionaron fueron la 11-TR1 y la 13-TR1 por ser las que mostraron un mejor comportamiento a campo. La 11-TR1 tendió a un mayor rendimiento por unidad de área comparado al resto, y en el caso de la 13-TR1 además del rendimiento, se tuvo en cuenta la estabilidad en rendimiento entre las repeticiones (considerando las barras de error, Figura 4.1. a).



**Figura 4.1.** Rendimiento ( $\text{g m}^{-2}$ ) a campo de dos líneas independientes de plantas  $P_{SARK::IPT}$  para los eventos a) TR1, b) TR4, c) PIF, d) segregantes no transgénica (SNT) y e) Box-plot del rendimiento ( $\text{g m}^{-2}$ ) para los genotipos (PIF, SNT, TR1, TR4). En las figuras a, b y d las barras rayadas representan a las líneas que fueron seleccionadas para la próxima generación para los experimentos a campo. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) por el test LSD de Fischer. Las barras verticales indican los errores estándar. Barra llena representa el PIF (c). En la figura e (Box Plot) las líneas horizontales representan la mediana y el punto la media.

Para el evento TR4 la variación en la respuesta del rendimiento por unidad de área fue más variable que la observada en TR1 (Figura 4.1. e). En este evento transgénico se

seleccionaron las líneas 2-TR4 y 12-TR4 con los mismos criterios de selección que en TR1 (Figura 4.1. b). En el caso de las líneas segregantes no transgénicas se seleccionaron las 34-SNT y 35-SNT que mostraron una respuesta cercana a la del cultivar PIF (Figura 4.1. c y d).

En resumen, las líneas con mejor performance en rendimiento por unidad de área que quedaron seleccionadas fueron 11-TR1 y 13-TR1 que representan al evento TR1, 2-TR4 y 12-TR4 que representan al evento TR4, dos líneas segregantes no transgénicas 34-SNT y 35-SNT que junto con el PIF conforman los testigos controles. Estas líneas constituyen el factor genotipo de los experimentos en parcelas que se describen a continuación, observándose en algunos casos la respuesta de cada línea por separado y en otros casos generalizando por grupo de genotipos (TR1, TR4 y SNT).

#### **4.3.2 Respuesta de los genotipos transgénicos a campo en condiciones hídricas contrastantes**

##### *4.3.2.1 Rendimiento y partición de biomasa*

El análisis estadístico de los resultados de rendimiento en granos por unidad de área obtenidos de los experimentos de FAUBA y Bordenave 2018 determinó que el efecto de la condición hídrica y el factor genotipo no presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $p \geq 0,05$ ; Cuadro 4.1). En el caso de Bordenave las precipitaciones ocurridas durante el ciclo del cultivo no permitieron obtener una condición de secano que se diferencie de la de riego (las precipitaciones importantes ocurridas en las primeras etapas del cultivo permitieron una recarga de los perfiles para las etapas más avanzadas del ciclo, impidiendo tener condiciones de restricción hídrica relevantes a lo largo del ciclo del cultivo).

Si bien a través del ANVA se determinó que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los genotipos, del análisis del test de medias surgió que el PIF bajo la condición de secano disminuyó un 10% el rendimiento en granos en el experimento de FAUBA (Cuadro 4.1). Esta diferencia fue estadísticamente significativa respecto de los eventos transgénicos tanto TR1 como de TR4 (con excepción de la línea 11-TR1) en la misma condición hídrica.

El evento TR1 en términos generales mantuvo el rendimiento en grano cuando pasó de una condición con riego a una de secano. De este modo la línea 11-TR1 generó un rendimiento similar en ambas condiciones hídricas y en ambos sitios (FAUBA y Bordenave), mientras que la línea 13-TR1 incrementó ligeramente (5%) el rendimiento cuando estuvo expuesta a una condición de secano en el experimento de FAUBA y un 16% en el experimento de Bordenave. Es importante recordar cómo fue descripto anteriormente que las condiciones de secano en ambas localidades fueron sustancialmente diferentes en el año de estudio como consecuencia de las precipitaciones ocurridas.

En el caso del evento TR4, este mostró un mejor comportamiento en la respuesta del rendimiento en granos en el experimento de FAUBA, con un aumento del 18% tanto con la línea 2-TR4 y 12-TR4 cuando pasó de riego a la condición de secano. No así en el experimento de Bordenave, en el cual disminuyó un 6% el rendimiento en ambas líneas cuando estuvo en la condición restrictiva (Cuadro. 4.1).

La respuesta de cada una de las segregantes no transgénicas (SNT) fue antagónica, donde la línea 34- SNT aumentó el rendimiento y la 35- SNT lo disminuyó cuando pasaron de una condición con riego a una condición de secano tanto en FAUBA como en Bordenave (Cuadro. 4.1). La línea 34-SNT aumentó el rendimiento en un 11% en ambos

experimentos, en cambio la línea 35-SNT disminuyó un 12% y 3% en el experimento de FAUBA y en el experimento de Bordenave, respectivamente.

Cuando el análisis se centró en la condición de secano (con las salvedades que esta condición no fue tan restrictiva como se había planeado originalmente), en FAUBA ambas líneas TR1 y TR4 seleccionadas rindieron entre un 11 y 15% más respecto de las líneas SNT (Cuadro 4.1). Sin embargo, esa tendencia no se observó en Bordenave y sólo la línea 12-TR4 mostró una ventaja en el rendimiento (ca. 8%) con respecto al resto de las líneas transgénicas y la SNT (Cuadro 4.1).

**Cuadro 4.1.** Rendimiento ( $\text{g m}^{-2}$ ), biomasa aérea ( $\text{g m}^{-2}$ ) e índice de cosecha del experimento de FAUBA y Bordenave durante el año 2018 para las distintas condiciones hídricas y genotipos. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) por el Test LSD de Fischer.

Condición hídrica (CH)	Genotipo (G)	FAUBA			Bordenave		
		Rendimiento ( $\text{g m}^{-2}$ )	Índice de cosecha	Biomasa aérea ( $\text{g m}^{-2}$ )	Rendimiento ( $\text{g m}^{-2}$ )	Índice de cosecha	Biomasa aérea ( $\text{g m}^{-2}$ )
Regado	PIF	513,7 <sup>ab</sup>	0,40 <sup>b</sup>	1178,4 <sup>abc</sup>	-	-	-
	11-TR1	513,60 <sup>ab</sup>	0,43 <sup>ab</sup>	1155,3 <sup>abc</sup>	751,3 <sup>a</sup>	0,47 <sup>a</sup>	1662,7 <sup>a</sup>
	13-TR1	500,57 <sup>ab</sup>	0,47 <sup>ab</sup>	1096,8 <sup>abc</sup>	722,6 <sup>a</sup>	0,43 <sup>ab</sup>	1609,6 <sup>a</sup>
	02-TR4	497,13 <sup>ab</sup>	0,43 <sup>ab</sup>	1131,1 <sup>abc</sup>	682,8 <sup>a</sup>	0,37 <sup>b</sup>	1808,5 <sup>a</sup>
	12-TR4	489,87 <sup>b</sup>	0,43 <sup>ab</sup>	1124,1 <sup>abc</sup>	792,9 <sup>a</sup>	0,47 <sup>a</sup>	1652,0 <sup>a</sup>
	34-SNT	507,9 <sup>ab</sup>	0,47 <sup>ab</sup>	1049,4 <sup>bc</sup>	694,9 <sup>a</sup>	0,47 <sup>a</sup>	1466,4 <sup>a</sup>
	35-SNT	585,1 <sup>a</sup>	0,43 <sup>ab</sup>	1296,6 <sup>a</sup>	736,3 <sup>a</sup>	0,47 <sup>a</sup>	1593,3 <sup>a</sup>
Secano	PIF	461,3 <sup>c</sup>	0,50 <sup>a</sup>	993,7 <sup>c</sup>	-	-	-
	11-TR1	530,2 <sup>abc</sup>	0,47 <sup>ab</sup>	1153,2 <sup>abc</sup>	636,2 <sup>a</sup>	0,40 <sup>ab</sup>	1514,1 <sup>a</sup>
	13-TR1	581,2 <sup>ab</sup>	0,47 <sup>ab</sup>	1231,3 <sup>ab</sup>	760,1 <sup>a</sup>	0,43 <sup>ab</sup>	1671,6 <sup>a</sup>
	02-TR4	593,4 <sup>a</sup>	0,50 <sup>a</sup>	1268,1 <sup>ab</sup>	644,8 <sup>a</sup>	0,40 <sup>ab</sup>	1569,2 <sup>a</sup>
	12-TR4	575,7 <sup>ab</sup>	0,50 <sup>a</sup>	1196,2 <sup>abc</sup>	807,4 <sup>a</sup>	0,40 <sup>ab</sup>	1834,0 <sup>a</sup>
	34-SNT	520,3 <sup>abc</sup>	0,50 <sup>a</sup>	1122,0 <sup>abc</sup>	781,4 <sup>a</sup>	0,47 <sup>a</sup>	1734,2 <sup>a</sup>
	35-SNT	517,6 <sup>abc</sup>	0,50 <sup>a</sup>	1005,1 <sup>c</sup>	711,7 <sup>a</sup>	0,47 <sup>a</sup>	1569,1 <sup>a</sup>
G		ns	ns	ns	ns	*	ns
CH		ns	*	ns	ns	ns	ns
G×CH		ns	ns	ns	ns	ns	ns

ns=diferencias no significativas; ns  $\geq 0,05$ ; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

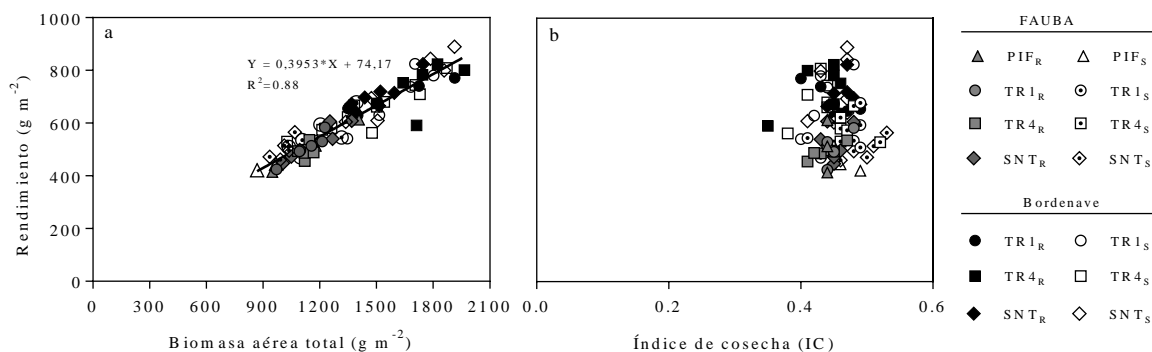
En cuanto a la partición de la biomasa aérea a granos, se observó que la condición hídrica tuvo un efecto estadísticamente significativo en el experimento de FAUBA, ya que en la condición de secano en promedio el IC fue mayor que en riego (0,44 vs 0,48). En Bordenave, a diferencia que en FAUBA, no se observaron diferencias significativas entre ambas condiciones hídricas, aunque sí se observaron diferencias entre genotipos, pero sin un patrón definido ya que mientras la línea 02-TR4 mostró el menor valor de IC en la



condición regado, en la condición de secano ambas líneas TR4 y la línea 11-TR1 mostraron el menor valor (Cuadro 4.1)

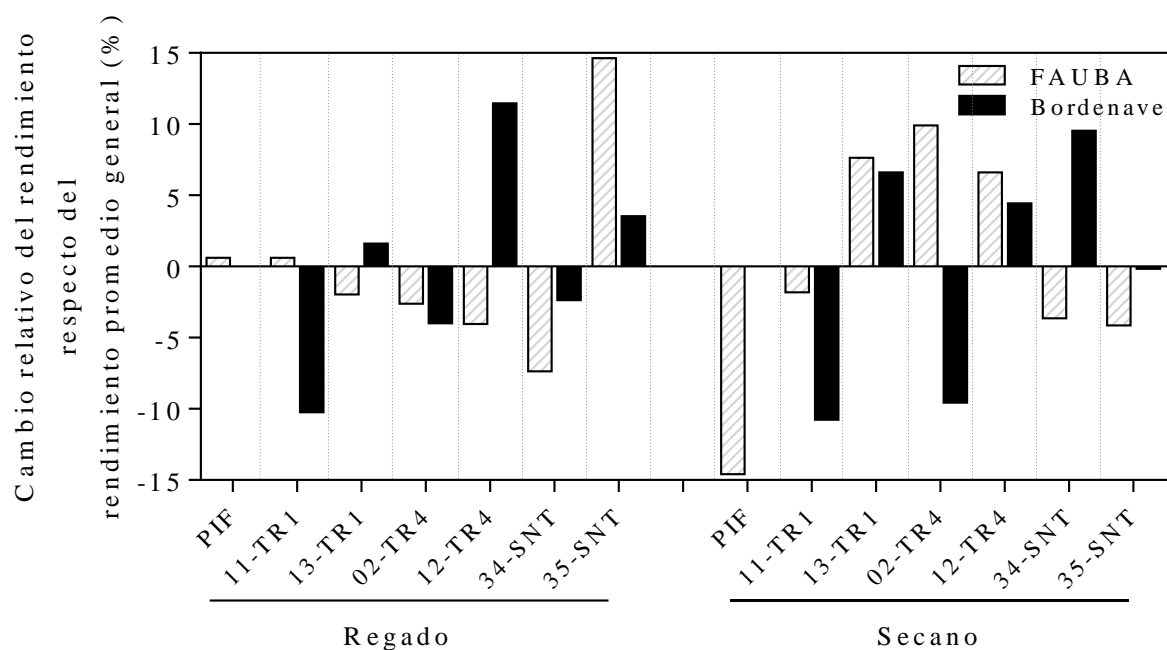
La biomasa aérea por unidad de área si bien no manifestó en su respuesta efectos directos de los tratamientos, ya sea por condición hídrica o por el factor genotipo, esta se modificó dependiendo de la combinación del genotipo, condición hídrica y el lugar donde se ejecutó el tratamiento (Cuadro 4.1). Se observó que el PIF disminuyó un 16% la biomasa aérea en el experimento de FAUBA cuando estuvo en una condición de secano, diferenciándose de manera estadísticamente significativa de los eventos transgénicos, puntualmente de las líneas 13-TR1 y 2-TR4 (Cuadro 4.1). En FAUBA en la condición de secano el PIF y la 35-SNT mostraron biomasa aérea significativamente menores que el resto de los genotipos, a diferencia de lo que ocurrió en la condición regado donde no se observó ninguna diferencia significativa entre las líneas. En el caso de Bordenave no se registraron diferencias significativas en la biomasa entre los genotipos entre ninguna de las líneas dentro de cada condición hídrica (Cuadro 4.1).

Cuando el rendimiento se contrastó con la biomasa aérea y el IC, los cambios en el rendimiento fueron principalmente explicados por las variaciones en la biomasa aérea ( $r^2 = 0,88$ ; Figura 4.2.a), sin que observara ninguna asociación con el IC ( $p \geq 0,05$ ; Figura 4.2.b).



**Figura 4.2.** Relación del rendimiento ( $\text{g m}^{-2}$ ) con (a) la biomasa aérea total ( $\text{g m}^{-2}$ ) y (b) el índice de cosecha para TR1 (11-TR1, 13-TR1), TR4 (2-TR4, 12-TR4), SNT (34-SNT, 35-SNT) y PIF en la condición hídrica con riego (subíndice “R”) y en secano (subíndice “S”) para los experimentos realizados a campo en Bordenave y en FAUBA en el año 2018.

Cuando se comparó el cambio relativo del rendimiento en granos por unidad de área de cada genotipo en relación con el rendimiento promedio general dentro de cada tratamiento (es decir el promedio de todos los genotipos dentro de cada condición hídrica) se evidenció que los materiales transgénicos en la condición de secano en general registraron respuestas positivas que llegaron a valores de ca. 10% respecto de la media (Figura 4.3). Por ejemplo, las líneas 13-TR1 y 12-TR4 mostraron, tanto en el experimento de FAUBA como en el de Bordenave, un cambio relativo positivo en promedio de ca. 7% y 6% respectivamente respecto del resto de los genotipos que crecieron en secano. Estas mismas líneas también manifestaron un cambio positivo dentro de la condición de riego en el experimento de Bordenave siendo dicho cambio de ca. 2% y 12% para las líneas 13-TR1 y 12-TR4, respectivamente (Figura 4.3).



**Figura 4.3.** Cambio relativo del rendimiento de cada genotipo respecto del rendimiento promedio general del tratamiento dentro de cada condición hídrica (Regado y Secano) para PIF, 11-TR1, 13-TR1, 2-TR4, 12-TR4, 34-SNT, y 35-SNT.

#### 4.3.2.2 Componentes numéricos del rendimiento

El peso promedio de los granos (P1000) y el número de granos  $\text{m}^{-2}$  (NG) no se vieron modificados de manera estadísticamente significativa entre la condición hídrica con riego y en seco ( $p \geq 0,05$ ; Cuadro 4.2).

**Cuadro 4.2.** Peso de mil granos (P1000, g), número de granos (NG m<sup>-2</sup>), número de espigas (m<sup>-2</sup>) y número de granos por espiga (NG espigas<sup>-1</sup>) del experimento de FAUBA y Bordenave para las distintas condiciones hídricas y genotipos. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) por el Test LSD de Fischer.

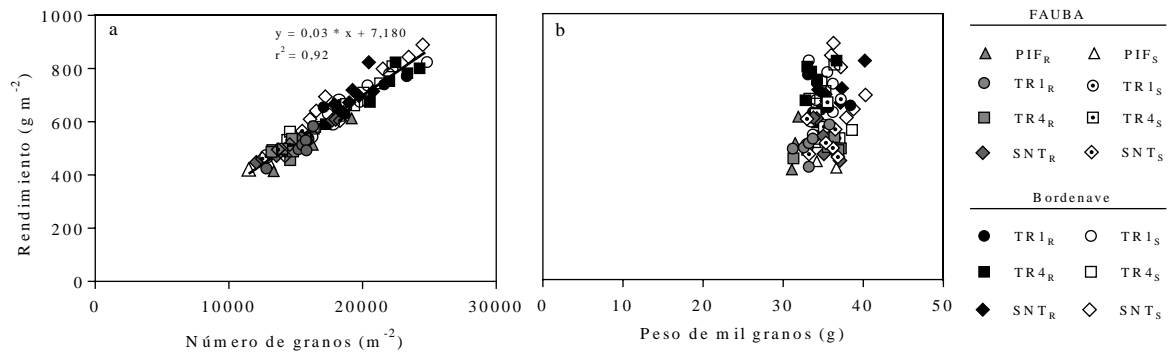
Condición hídrica (CH)	Genotipo (G)	FAUBA				Bordenave			
		P1000 (g)	NG (m <sup>2</sup> )	Espigas (m <sup>2</sup> )	NG espiga <sup>-1</sup>	P1000	NG (m <sup>2</sup> )	Espigas (m <sup>2</sup> )	NG espiga <sup>-1</sup>
Regado	PIF	31,5 <sup>c</sup>	16272,0 <sup>abc</sup>	495 <sup>cde</sup>	22,8 <sup>a</sup>	-	-	-	-
	11-TR1	33,4 <sup>abc</sup>	15485,2 <sup>abc</sup>	585 <sup>abc</sup>	21,8 <sup>abc</sup>	34,5 <sup>cd</sup>	21828,0 <sup>a</sup>	720 <sup>bcd</sup>	30,7 <sup>a</sup>
	13-TR1	33,4 <sup>abc</sup>	14975,3 <sup>abc</sup>	550 <sup>bcd</sup>	22,2 <sup>ab</sup>	35,2 <sup>cd</sup>	20674,8 <sup>a</sup>	713 <sup>bcd</sup>	28,7 <sup>a</sup>
	02-TR4	34,4 <sup>ab</sup>	14440,6 <sup>abc</sup>	607 <sup>ab</sup>	21,3 <sup>abcd</sup>	33,5 <sup>d</sup>	20392,5 <sup>a</sup>	773 <sup>abcd</sup>	26,3 <sup>a</sup>
	12-TR4	35,7 <sup>ab</sup>	13753,7 <sup>bc</sup>	580 <sup>abc</sup>	20,0 <sup>de</sup>	34,6 <sup>cd</sup>	22919,2 <sup>a</sup>	883 <sup>a</sup>	26,3 <sup>a</sup>
	34-SNT	35,1 <sup>ab</sup>	13570,7 <sup>bc</sup>	550 <sup>bcd</sup>	21,1 <sup>abcd</sup>	35,0 <sup>cd</sup>	19846,3 <sup>a</sup>	740 <sup>abcd</sup>	27,3 <sup>a</sup>
	35-SNT	34,3 <sup>ab</sup>	17049,7 <sup>a</sup>	670 <sup>a</sup>	21,1 <sup>abcd</sup>	38,3 <sup>ab</sup>	19215,9 <sup>a</sup>	667 <sup>cd</sup>	29,4 <sup>a</sup>
Secano	PIF	35,0 <sup>ab</sup>	13232,3 <sup>b</sup>	473 <sup>de</sup>	20,3 <sup>bcd</sup>	-	-	-	-
	11-TR1	33,4 <sup>abc</sup>	15834,4 <sup>ab</sup>	583 <sup>abc</sup>	21,1 <sup>abcd</sup>	35,5 <sup>cd</sup>	17869,8 <sup>a</sup>	653 <sup>d</sup>	27,4 <sup>a</sup>
	13-TR1	35,8 <sup>ab</sup>	16278,3 <sup>b</sup>	570 <sup>abcd</sup>	19,6 <sup>d</sup>	34,3 <sup>cd</sup>	22205,8 <sup>a</sup>	817 <sup>abc</sup>	27,4 <sup>a</sup>
	02-TR4	36,0 <sup>a</sup>	16530,4 <sup>a</sup>	597 <sup>abc</sup>	20,0 <sup>cd</sup>	36,0 <sup>bcd</sup>	18009,1 <sup>a</sup>	690 <sup>cd</sup>	27,5 <sup>a</sup>
	12-TR4	34,5 <sup>ab</sup>	16687,2 <sup>a</sup>	553 <sup>bcd</sup>	20,9 <sup>abcd</sup>	34,5 <sup>cd</sup>	23432,1 <sup>a</sup>	850 <sup>ab</sup>	27,5 <sup>a</sup>
	34-SNT	35,4 <sup>ab</sup>	14838,0 <sup>abc</sup>	543,3 <sup>bcd</sup>	20,3 <sup>cd</sup>	36,7 <sup>abc</sup>	21345,6 <sup>a</sup>	890 <sup>a</sup>	24,2 <sup>a</sup>
	35-SNT	35,0 <sup>ab</sup>	14754,0 <sup>abc</sup>	436,7 <sup>e</sup>	20,8 <sup>bcd</sup>	38,8 <sup>a</sup>	18429,0 <sup>a</sup>	630 <sup>d</sup>	29,5 <sup>a</sup>
G		ns	ns	*	ns	**	ns	**	ns
CH		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
G×CH		ns	ns	*	ns	*	ns	ns	ns

ns=diferencias no significativas; ns  $p \geq 0,05$ ; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

Tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas en el número de granos generado por los distintos genotipos (ni entre las líneas dentro de cada uno de ellos) sea en FAUBA o en Bordenave ( $p \geq 0,05$ ; Cuadro 4.2). Tal como se indica en la Figura 4.4, las variaciones en el rendimiento fueron explicadas por cambios en el número de granos por unidad de área ( $r^2 = 0,92$ ;  $p < 0,001$ ) y no por los cambios en el peso promedio de los

granos ( $p \geq 0,05$ ). De este modo, las variaciones detalladas en el rendimiento entre genotipos anteriormente se aplican a los cambios observados en el número de granos.

A diferencia del número de granos, el peso de los granos mostró diferencias estadísticamente significativas para el factor genotipo en el experimento de Bordenave. Sin embargo, también en dicho experimento se observó una interacción GxCH ya que el patrón de cambio en el P1000 fue diferente entre los genotipos en la condición de riego respecto de la de secano (Cuadro 4.2).



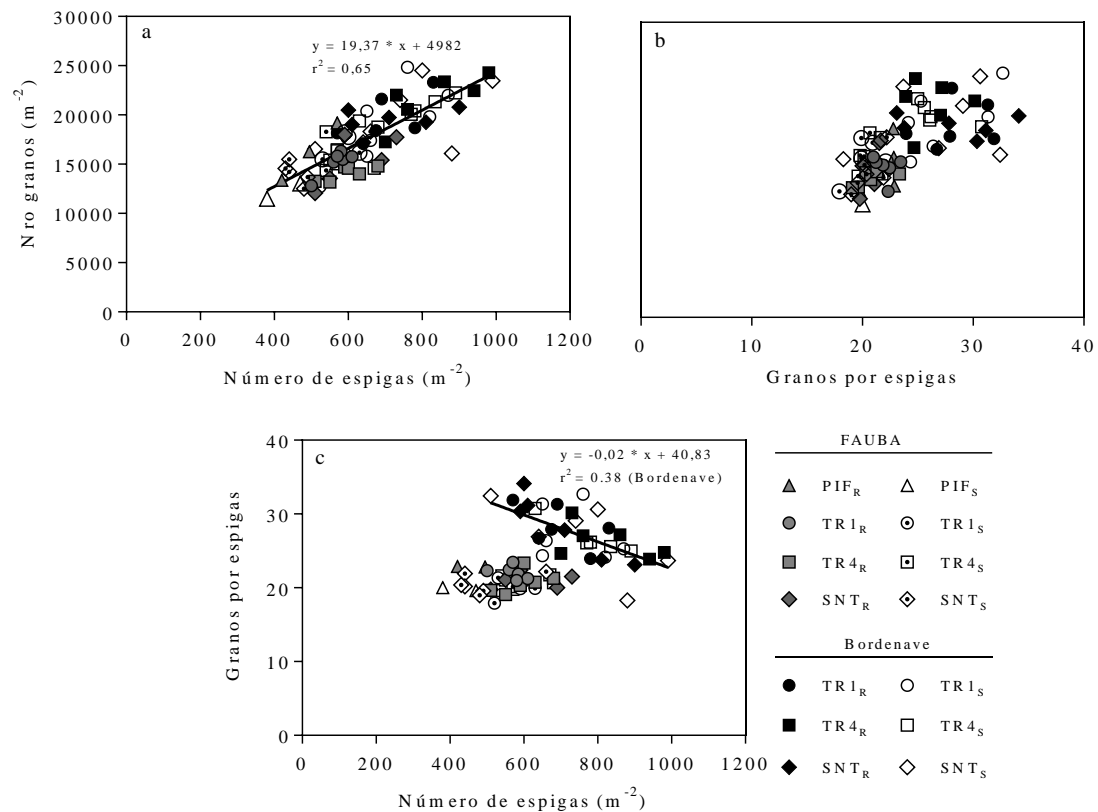
**Figura 4.4.** Relación del rendimiento (g m<sup>-2</sup>) con (a) el número de granos (m<sup>-2</sup>) y (b) el peso de granos (g) para TR1 (11-TR1, 13-TR1), TR4 (2-TR4, 12-TR4), SNT (34-SNT, 35-SNT) y PIF en la condición hídrica con riego (subíndice “R”) y en secano (subíndice “S”) para los experimentos realizados a campo en Bordenave y en FAUBA en el año 2018.

El número de espigas por unidad de área en los experimentos 2018 de FAUBA y Bordenave no fue afectado por la condición hídrica, lo que determinó que la respuesta tanto con riego y en secano fuera similar ( $p \geq 0,05$ ; Cuadro 4.2). No obstante, se observaron diferencias estadísticamente significativas con el factor genotipo, la cual fue consistente en ambos experimentos ( $p < 0,05$  en FAUBA y  $p < 0,01$  en Bordenave; Cuadro 4.2); sin embargo, el patrón no fue uniforme en cuanto al comportamiento de los genotipos. Por ejemplo, en FAUBA la línea 35-SNT fue la que mostró el mayor valor de número de espigas en el tratamiento regado mientras que en el tratamiento de secano fue la que registró

el menor valor. En la misma localidad (FAUBA) los genotipos TR1 y TR4 mantuvieron un número similar de espigas en el tratamiento de secano comparado con el tratamiento regado (Cuadro 4.2). En Bordenave no se observó interacción GxCH aunque el patrón de establecimiento de espigas no fue consistente entre genotipos. En el tratamiento regado el genotipo 12-TR4 fue el que registró el mayor valor de espigas por unidad de área mientras que en secano dicha línea junto con el 13-TR1 y 34-SNT fueron las que mostraron los mayores valores ( Cuadro 4.2).

Con respecto al número de granos por espiga, este atributo no manifestó diferencias estadísticamente significativas entre la condición hídrica ni tampoco entre genotipos tanto en el experimento de Bordenave. Sin embargo se observó una interacción GxCH en el caso de la FAUBA (Cuadro 4.2).

Por otro lado, cuando se relacionó el número de granos por unidad de área con ambos sub-componentes (número de espigas y número de granos por espigas) se observó una asociación más robusta y positiva con el número de espigas ( $r^2 = 0,65$ ;  $p < 0,001$ ; Figura 4.5.a) que con el número de granos por espiga (Figura 4.5 b).



**Figura 4.5.** Relación entre el número de granos (m<sup>-2</sup>) con (a) el número de espigas (m<sup>-2</sup>) y (b) el número de granos por espiga y relación (c) entre el número de granos por espigas y el número de espigas (m<sup>-2</sup>) para TR1 (11-TR1, 13-TR1), TR4 (2-TR4, 12-TR4), SNT (34-SNT, 35-SNT) y PIF en la condición hídrica con riego (subíndice “R”) y en seco (subíndice “S”) para los experimentos realizados a campo en Bordenave y en FAUBA en el año 2018.

El número de granos por espiga mostró una asociación negativa con el número de espigas por unidad de área cuando se consideraron los datos correspondiente al experimento de Bordenave, ajustandose a una misma regresión lineal tanto para la condición hídrica como para los genotipos ( $r^2 = 0,38$ ;  $p < 0,001$ , Bordenave; Figura 4.6.c). Sin embargo, en el experimento de FAUBA no se observó ninguna asociación entre ambos componentes.

#### 4.4 Discusión

En este capítulo se abordó el análisis de la primera aproximación del comportamiento agronómico del trigo transgénico P<sub>SARK</sub>::IPT en condiciones de campo y a escala de cultivo. Si bien numerosos trabajos han documentado respuestas fisiológicas y morfológicas de plantas transgénicas P<sub>SARK</sub>::IPT de otras especies, tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas, estos han sido conducidos en la mayoría en macetas bajo condiciones controladas y a nivel de planta individual (Rivero et al., 2007, 2010; Peleg et al., 2011; Kuppu et al., 2013; Reguera et al., 2013; Oneto et al., 2016). En el capítulo 3 de esta tesis se demostró, en condiciones controladas, una importante interacción genotipo x ambiente lo que determinó una falta de consistencia en el comportamiento de ambos eventos transgénicos en el rendimiento y sus componentes. De este modo, las potenciales ventajas observadas en un ambiente no perduraban en otro ambiente al que fueron expuestos los genotipos.

Los resultados de los experimentos conducidos a campo en el marco de esta tesis mostraron, consistentemente con lo descrito en el capítulo anterior, que las plantas de trigo transgénico P<sub>SARK</sub>::IPT en general tuvieron un comportamiento estadísticamente similar al control sin manifestar penalizaciones en el rendimiento de granos tanto en la condición hídrica con riego como de seco (Cuadro 4.1). La condición ambiental no permitió generar grandes diferencias en la condición hídrica del suelo (condición con riego vs. condición de seco) debido a que las precipitaciones no fueron extremadamente diferentes entre ambos tratamientos durante la estación de crecimiento del cultivo en ambos sitios de experimentos (FAUBA y Bordenave). A pesar de ello, se observó que el trigo transgénico tendió a obtener valores de rendimiento por encima del trigo no transgénico cuando exploraron condiciones de seco. Dentro de esta condición hídrica el rendimiento en grano



del trigo que contenía el transgén  $P_{SARK::IPT}$  en el experimento de FAUBA fue superior ca. 23% respecto a PIF siendo una diferencia estadísticamente significativa, y también fue superior ca.13% con respecto a las segregantes no transgénicas (SNT) aunque en este caso sin diferenciarse estadísticamente. En el experimento de Bordenave tanto los eventos transgénicos como las SNT no manifestaron diferencias estadísticas creciendo en seco, aunque como fue detallado anteriormente no se manifestó una situación hídrica limitante a pesar de estar en condición de seco; sólo el TR4 tendió a establecer un mayor rendimiento (ca. 12%) comparado al genotipo control (SNT) y a el TR1 dentro de dicha condición hídrica. En todos los casos el número de granos fue el componente de rendimiento que explicó las variaciones en rendimiento ( $r^2 = 0,92$ ) sin observarse cambios por el peso de los mismo (Figura 4.4). La diferencia en los resultados entre los sitios experimentales evaluados en este Capítulo (FAUBA y Bordenave) podrían estar vinculados a la magnitud y al momento en que se produjo la restricción hídrica en ambos sitios.

En este sentido, algunas evidencias de la literatura mostraron respuestas diferentes en experimentos que se realizaron a campo con algodón transgénico  $P_{SARK::IPT}$  en dos sitios diferentes (Zhu et al., 2018). Los resultados de Zhu et al. (2018) evidenciaron resultados contrastantes en rendimiento dentro de la condición hídrica de seco, ya que en uno de los sitios no se detectaron diferencias en este atributo entre las plantas de algodón transgénico  $P_{SARK::IPT}$  y las plantas control, y en el otro sitio obtuvieron como resultado que el algodón transgénico  $P_{SARK::IPT}$  superó a las plantas control (ca. 44% más de semillas, diferencia estadísticamente significativa). Los autores determinaron que las diferencias en sus resultados estaban vinculadas con el momento en que ocurría el estrés dentro del ciclo ontogénico del algodón transgénico  $P_{SARK::IP}$  y sobre todo que la intensidad del déficit

hídrico era importante para que se observaran las ventajas del transgén  $P_{SARK}::IPT$  sobre el rendimiento de semillas (Zhu et al., 2018). Otro trabajo a campo donde se utilizaron plantas de maní con el transgén  $P_{SARK}::IPT$  en dos años consecutivos para un mismo sitio, mostró en la condición de déficit hídrico una ventaja en el rendimiento en plantas transgénicas respecto a las plantas control. El incremento del rendimiento en las plantas transgénicas  $P_{SARK}::IPT$  entre los años varió entre 51% y 65%. En este sentido, se sabe que la expresión de gen *ipt*, bajo el control de un promotor inducible por déficit de agua (SARK), confiere una mayor tolerancia al déficit hídrico en plantas de tabaco transgénicas obteniéndose resultados similares en arroz, maní y algodón (Peleg et al., 2011; Quin et al., 2011; Kuppu et al., 2013). Esto podría estar explicando algunas respuestas en el trigo transgénico  $P_{SARK}::IPT$  cuando se compara con plantas de trigo no transgénicas en una condición de secano, ya que la condición hídrica a la cual fueron sometidas las plantas no llega a ser de tal magnitud que permita la inducción del transgén  $P_{SARK}::IPT$  y por lo tanto no se detecten las diferencias entre ambos tratamientos. Cuando se comparó el cambio relativo del rendimiento en granos por unidad de área de cada genotipo en relación con el rendimiento promedio general dentro de cada tratamiento, el trigo transgénico  $P_{SARK}::IPT$  mostró valores positivos ca. 10% por encima del promedio. Similares respuestas se mostraron con el maíz transgénico MON87460×NK603, donde el rendimiento de estas plantas transgénicas fue mayor ca. 5-10% más que las plantas control (Castiglioni et al., 2008). Recientemente, se ha publicado un trabajo que compila una amplia red de ensayos a campo comparando trigos transgénicos transformados con el gen HaHB4 con el objetivo de mejorar la tolerancia al déficit hídrico, demostrando una mejora del rendimiento de granos en un 6% a favor de los trigos transformados respecto de los testigos (González et al.,

2019). En los mencionados casos, se observa una relación directa entre la demanda del ambiente y la respuesta diferencial de los eventos transgénicos. En este sentido se observa que cuanto más restrictiva es la condición de cultivo, mayor diferencia se registra entre los eventos y el correspondiente control.

Tal como fue descripto anteriormente, el rendimiento estuvo explicado por los cambios en el número de granos por unidad de área ( $r^2 = 0,65$ ), y las variaciones de este último estuvieron asociadas al número de espigas por unidad de área ( $r^2 = 0,65$ ). La literatura indica que el número de granos por unidad de área puede estar relacionado con el número de granos por espigas y el número de espigas por unidad de área (De Vita et al., 2007; Elhani et al., 2007), a diferencia de los datos de esta tesis donde las variaciones en el número de granos por unidad de área no se asociaron con los cambios en el número de granos por espiga. Se ha demostrado que las citoquininas se producen en el sistema radical actuando en varios procesos fisiológicos, como el desarrollo de la semilla y el crecimiento de yemas axilares (Tamas, 1995). En este sentido, distintos estudios vinculados a la regulación hormonal en gramíneas informan que el crecimiento de vástagos secundarios (macollos) está dado por la activación de yemas laterales a través de las citoquininas (Langer et al., 1973; Sharif y Dale et al., 1980; Suge y Iwamura, 1993). Estas evidencias no excluyen la posibilidad de que el aumento en el número de espigas por unidad de área en los trigos transgénicos sea atribuible al posible incremento del nivel de citoquininas dentro de la planta provocado por la expresión del gen *ipt*. En experimentos a campo con arroz se evaluó el efecto del incremento del nivel de citoquininas aplicadas de manera exógena para evaluar su efecto en el crecimiento y el rendimiento obteniendo como resultado un

incremento significativo del número de macollos, un mayor número de panículas y por ende un mayor rendimiento (Zahir, et al., 2001).

El número de granos por espigas no tuvo diferencias en ninguna condición hídrica ni tampoco entre las plantas transgénicas y las plantas control posiblemente asociado a que la condición de secano no logró generar un estrés por déficit hídrico que llegue a reducir el número de espiguillas fértiles por espiga (o el número de granos por espiguilla) como se ha demostrado ampliamente en la literatura (Oosterhuis y Cartwright, 1983; Frank y Black 1987; McMaster et al., 1994; Elhani et al., 2007; Agami et al., 2018; Vahamidis et al., 2019).

Desde el punto de vista de los componentes fisiológicos, los cambios en el rendimiento fueron explicados por las variaciones en la biomasa aérea ( $r^2 = 0,88$ ), sin que observara ninguna asociación con el IC (Figura 4.3). Sin embargo, no se registraron diferencias significativas en ambos componentes fisiológicos del rendimiento cuando se compararon las plantas transgénicas con los controles. En la única condición donde se observaron cambios en el IC fue Bordenave dentro de la condición de secano, el cual estuvo dado por un menor IC en las plantas transgénicas respecto al control. A pesar de que las plantas transgénicas tuvieron un IC más bajo respecto a las plantas no transgénicas (0,40 vs 0,47), ello no se tradujo en un menor rendimiento en grano. Esta respuesta fue distinta en maíz transgénico  $P_{SARK}::IPT$  expuesto a déficit hídrico, el cual tuvo una respuesta significativamente más alta en IC respecto a plantas no transgénicas dentro de esa condición hídrica (Oneto et al., 2016). También fue distinto a lo informado para trigos transgénicos cultivados a campo que utilizan otros genes con las mismas estrategias de generar tolerancia a déficit hídrico donde trigos transgénicos DREB1A mantuvieron un IC

similar a las plantas no transgénicas con incrementos significativos en la biomasa aérea y reducciones en el rendimiento (Pierre et al., 2012). En otro ejemplo, donde se evaluaron trigos transgénicos HaHB4 también se mantuvo el IC similar entre plantas transgénica y control, pero las transgénicas generaron una mayor biomasa aérea y un mayor rendimiento (González et al., 2019).

En trabajos previos donde se ha utilizado para inducir la transcripción del transgén *ipt* el promotor SAG12 en el lugar del promotor SARK, las plantas transgénicas con el transgén  $P_{SAG12}::IPT$  no mostraron diferencias significativas en rendimiento ni en sus componentes como número y peso de granos cuando se compararon con plantas no transgénicas (Sýkorová et al. 2008). En forma análoga, otros estudios con plantas transgénicas  $P_{SAG12}::IPT$  en yuca y petunia tampoco informaron una mejora significativa en los rendimientos (Ma et al., 2008; Zhang et al., 2010). Estas evidencias demuestran efectos contradictorios en cuanto a las ventajas de la introgresión del transgén IPT y además que distintos promotores del transgén (SAG o SARK) pueden determinar respuestas diferentes en las plantas donde fueron introgresados. En esta tesis, la introducción del promotor transgénico  $P_{SARK}$  si bien no muestra una respuesta consistentemente positiva en condiciones de secano respecto del control, tampoco presenta una penalización en condiciones de alta oferta de recursos. Estos resultados fueron análogos a los encontrados en maíz donde no se observó una tendencia consistente de las ventajas de la introgresión del transgén en eventos transgénicos en los diferentes ambientes (Oneto et al., 2016), similar a lo que ocurrió con los eventos transgénicos  $P_{SARK}::IPT$  en trigo utilizados en esta tesis. De este modo, las plantas de trigo transgénicas  $P_{SARK}::IPT$  podrían presentar algunas ventajas en condiciones de estrés hídricos (dependiendo del ambiente) sin mostrar efectos

contraproducentes cuando se las expone a condiciones de alta oferta de recursos (Rivero et al., 2007).

Otro aspecto relevante es la variabilidad entre las plantas pertenecientes a un mismo evento transgénico donde, por ejemplo, las diferencias en rendimiento estuvieron dadas por la línea sobre todo 13-TR1 del evento TR1 y la línea 12-TR4 del evento TR4, demostrando que hubo variabilidad en las diferentes líneas conteniendo el mismo transgén  $P_{SARK}::IPT$ . Estas evidencias sugieren que existe una importante interacción entre el fondo génico y el transgén. Dicha interacción puede estar asociada a la presencia de otros alelos, al número de copias del transgén, y a la influencia de la epigenética (condiciones en las que se formaron las semillas en la planta madre y que pueden influir sobre la performance de la descendencia). Este último aspecto se aborda en el capítulo siguiente.

#### **4.5 Conclusión**

Los experimentos a campo permitieron tener las primeras aproximaciones en el comportamiento agronómico de trigo transgénico  $P_{SARK}::IPT$  que, tal como fue demostrado en los resultados, se comportaron de manera similar a las plantas de trigo no transgénicas con los mismos rasgos fenotípicos. Los trigos transgénicos en términos generales no mostraron penalizaciones en el rendimiento en condiciones potenciales y dependiendo del ambiente en que fueron evaluados evidenciaron ventajas de hasta un 10% del rendimiento superior respecto a la media general del experimento.

## CAPÍTULO 5

---

### **RESPUESTA AL AMBIENTE MATERNO EN LAS PLANTAS TRANSGÉNICAS P<sub>SARK::</sub>IPT Y EN SUS CONTROLES NO TRANSGÉNICOS**

#### **5.1 Introducción**

El estrés por déficit hídrico es uno de los principales estreses abióticos que afecta la producción de trigo (*Triticum aestivum* L.). Dichos estreses generan cambios en una amplia gama de procesos fisiológicos y bioquímicos, incluyendo la disminución de agua en la planta, inhibición de procesos fotosintéticos, daño inducido por el estrés oxidativo y así sucesivamente hasta generar un retraso en el crecimiento y reducción del rendimiento del cultivo (Perdomo et al., 2015; Saeidi y Abdoli, 2015; Daryanto et al., 2017)

Ante un determinado nivel de déficit hídrico las plantas tienen la capacidad de sobrevivir y crecer con bajo suministro de agua desarrollando determinados mecanismos a nivel morfológico, fisiológico y molecular (Farooq et al., 2009; Passioura y Angus; 2010). Incluso tienen la posibilidad de modular la respuesta cuando se enfrenta a cambios en el ambiente (Hirayama et al., 2010), lo que les permite generar una variación fenotípica que module la adaptabilidad de un cultivo a cambios medioambientales de corto y largo plazo, y también ser transmitida a su descendencia. Esta variación fenotípica puede estar dada por cambios epigenéticos, donde un mismo genotipo puede mostrar fenotipos alternativos a través de cambios en la regulación de la expresión génica, sin observar modificaciones en

la secuencia de nucleótidos y controlar la regulación de la expresión génica (Richards, 2006). Por lo tanto, cambios en las condiciones ambientales pueden inducir cambios significativos en las marcas epigenéticas que pueden desempeñar un papel importante en las respuestas plásticas al ambiente (Mirouze y Paskowsko, 2011; Richards et al., 2011), y que han sido particularmente estudiadas en la respuesta de las plantas al estrés ambiental (Bruce et al., 2007). Esto puede ser de especial relevancia en poblaciones con escasa variabilidad genotípica.

Se ha demostrado que una exposición previa a un estrés podría mejorar la tolerancia a estreses posteriores en las generaciones subsiguientes produciendo en las plantas de la nueva generación una “memoria de estrés” (Bruce et al., 2007; Chinnusamy y Zhu, 2009; Slaughter et al., 2012; Pastor et al., 2013). Estas respuestas pueden estar dadas a corto plazo por señales químicas disparadas por el estrés o a largo plazo a través de modificaciones epigenéticas como la metilación del ADN y/ o modificaciones en las histonas que son los mecanismos potenciales para la memoria transgeneracional (Chinnusamy y Zhu, 2009; Hauser et al., 2011; Sani et al., 2013; Migicovsky et al., 2014).

Cada vez hay más evidencias que indican que los mecanismos epigenéticos contribuyen al estrés y a la memoria en las plantas, por lo que se puede especular que muchas respuestas de estrés transgeneracional observadas podrían deberse a mecanismos epigenéticos (Kumar et al., 2016). El interés en estudiar los efectos de episodios de estrés abiótico ocurridos en las generaciones anteriores o en el estado previo a la etapa reproductiva (es decir en la etapa vegetativa) cada vez es mayor, debido que esto tiene una relevancia importante en la fisiología de estrés vegetal (Chen y Arora, 2013; Backhaus et al., 2014; Banik et al., 2016; Abid et al., 2018). Algunas evidencias han indicado que una exposición previa a diferentes



tipos de estrés podría modificar la respuesta posterior y eventualmente preparar a las plantas para una respuesta más rápida o más activa al estrés futuro (Walter et al., 2011; Li et al., 2014; Ramirez et al., 2015). En trigo se demostró que las plantas que estuvieron expuestas a déficit hídrico durante la etapa vegetativa de crecimiento mejoraron la tolerancia a bajas temperaturas en el estado de vaina engrosada (Li et al., 2015) y al estrés por déficit hídrico o altas temperaturas durante la etapa de llenado de los granos (Wang et al., 2014 a, b). Asimismo, se observó que la descendencia de plantas de trigo que estuvieron estresadas por déficit hídrico mejoró la tolerancia al estrés por alta temperatura después de la antesis a través de una mejora en la fotosíntesis y en la capacidad antioxidante inducida (Zhang et al., 2016). En cebada también se estudió el efecto transgeneracional de plantas que estuvieron expuestas a un déficit hídrico en la etapa de hoja bandera. En este caso se observaron alteraciones en la morfología y en la topología de las plantas de la progenie que estuvo con déficit hídrico comparado a la progenie que creció en condiciones óptimas (Nosalewicz et al., 2016). Otro caso es en arroz, donde la progenie de plantas con estrés hídrico podría inducir la acumulación de prolina a través de la expresión regulada de genes que codifican para la síntesis de prolina en paralelo con una mayor desmetilación del ADN cuando la progenie está expuesta también a un déficit hídrico (Zhang et al., 2013).

En trabajos en los que se evaluó la heredabilidad de los efectos de estrés hídricos por déficit a través de varias generaciones en trigo, las plantas pertenecientes a la progenie de ambiente materno con déficit hídrico cuando estuvieron expuestas a un mismo estrés manifestaron un aumento en el ajuste del potencial osmótico interno (Wang et al., 2018). Esto les permitió mantener un mayor contenido de agua en la planta, contribuir a una menor inhibición de la fotosíntesis y una mayor capacidad de eliminación de radicales libres. No

hubo diferencias significativas en respuesta a la tolerancia al déficit hídrico entre las generaciones por lo que no se observó un incremento de la tolerancia a medida que avanzaron las mismas (Wang et al., 2018). Tampoco se observó efectos negativos en los procesos fisiológicos y en rendimiento en granos de la progenie que no se expuso a déficit hídrico (Wang et al., 2018).

El objetivo de este capítulo fue evaluar si las plantas que portan el transgén P<sub>SARK::IPT</sub> y las plantas control no transgénicas presentan alguna herencia transgeneracional de adaptación ambiental, en relación al objetivo particular III.

## **5.2 Materiales y métodos**

### **5.2.1 Condiciones generales, diseño experimental y tratamientos**

Los experimentos que se llevaron a cabo para responder al objetivo del presente capítulo se ejecutaron en condiciones controladas generando una estructura de microcultivo. Las condiciones generales, diseño experimental y tratamientos fueron descritos en el Capítulo 2 de la tesis (Estructura experimental) en la sección 2.3.1.2 “Experimentos a nivel microcultivo”.

En resumen, se realizaron tres experimentos donde se combinaron tres factores: i) el factor genotipo (PIF, TR1 y TR4), ii) la condición hídrica (Regado y Déficit hídrico) y iii) ambiente materno (con riego-Rm y con déficit hídrico-DHm). Para el factor ambiente materno se utilizaron semillas de los genotipos PIF, TR1 y TR4 recolectadas de los experimentos denominados “nivel planta individual” (en el Capítulo 2 sección 2.3.1.1 y descritos los resultados en el Capítulo 3) discriminando por el ambiente materno en que se originaron. Los experimentos fueron conducidos en contenedores de 1m<sup>3</sup> generando una estructura de microcultivo con una densidad de 200 plantas m<sup>-2</sup>. La fecha de siembra para

los tres años de experimentos fue el 24 de mayo y el diseño experimental fue de parcelas sub-divididas completamente aleatorizadas con tres repeticiones donde la parcela principal se asignó a la condición hídrica, la sub-parcela el genotipo y la sub-sub-parcela el ambiente materno donde se originaron. Un experimento fue conducido en el año 2016 donde sólo se sembró el genotipo PIF y los otros dos experimentos fueron llevado a cabo en los años 2017 y 2018 en los cuales se sembraron, junto con el PIF, los genotipos transgénicos P<sub>SARK</sub>::IPT (TR1 y TR4).

### **5.2.2 Mediciones y análisis**

#### *5.2.2.1 Mediciones realizadas*

Área foliar verde: Se midió el área foliar de las primeras cuatro hojas (hojas preformadas en el embrión) de plántulas originadas de semillas que provenían de ambiente materno con riego (Rm, considerado como control) y de ambiente materno con déficit hídrico (DHm). Asimismo, avanzado el ciclo en las mismas plantas se midió el área foliar de la hoja bandera (HB) y las inmediatamente por debajo, las cuales se identificaron con el número de ubicación dentro del vástago principal teniendo como referencia la HB como la hoja cero y la 1 la siguiente por debajo (HB-1), y así consecutivamente. En los experimentos de los años 2016 y 2017 se midieron las primeras cuatro hojas. En el experimento del año 2017 además, se midió la HB y las cuatro hojas por debajo (HB-1, HB-2, HB-3 y HB-4), lo mismo para el experimento del 2018 con excepción de la hoja HB-3 y HB-4. La medición del área foliar se realizó en el momento en que la hoja estaba totalmente expandida utilizando la misma metodología que se utilizó el capítulo 3, mediante el uso de la ecuación 3.5.

*Rendimiento y componentes numéricos*: se procedió con el mismo protocolo que se utilizó en el Capítulo 4. Para el análisis de los cambios en la respuesta de los distintos atributos por efecto del ambiente materno, se realizó el cálculo de la media general de todo el experimento para cada uno de los parámetros analizados sin discriminar por factores (tanto en el experimento del año 2017 como del año 2018). En base a este dato se relativizó el valor de cada de cada genotipo dentro de cada condición hídrica y ambiente materno. Estos valores varían entre 0 y 2, donde 1 es el valor de la media general del experimento.

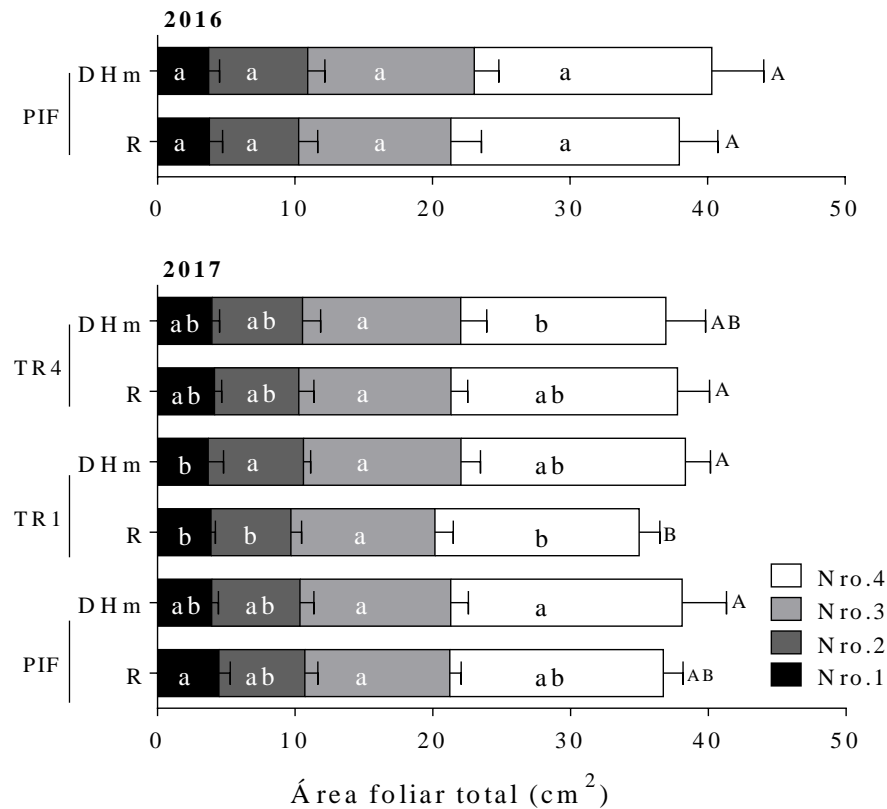
#### *5.2.2.2 Análisis estadístico de los datos*

Para el análisis de datos se utilizó el programa de InfoStat Profesional v.1.1 (Di Renzo et al., 2011), el cual permitió realizar la prueba de diferencias estadísticas entre los tratamientos mediante el análisis de varianzas (ANVA) con un diseño de parcelas subdivididas. Las medias de los tratamientos se compararon con el test LSD (Least significant difference) de Fisher con un nivel de significación de 0,05.

### **5.3 Resultados**

#### *5.3.1.1 Área foliar al inicio de macollaje y en hoja bandera completamente expandida para distintos estratos foliares*

En el experimento 2016 se observó que el PIF no mostró diferencias en la primera hoja entre los ambientes maternos con riego (Rm) y con déficit hídrico (DHm). En el resto de las hojas de las plantas que se generaron de las semillas que estuvieron en un ambiente materno restrictivo (DHm) mostraron una tendencia en promedio ca. 8% más de área foliar total por hoja.



**Figura 5.1.** Área foliar verde total (cm<sup>2</sup>) de la primera hoja (Nro.1) a la cuarta (Nro.4) del vástago principal de plantas correspondientes a la progenie de los genotipos PIF, TR1 y TR4 que se originaron en un ambiente materno con riego (R) y con déficit hídrico (DHm) en el período crítico. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) para cada hoja en particular (letras minúsculas) y para el área foliar total (letras mayúsculas).

En el experimento del año 2017, la respuesta en el área foliar total de la primera hoja fue igual al experimento del año 2016. La primera hoja del PIF registró la misma área foliar cuando la planta provenía de progenie de plantas que estuvieron expuestas a un DHm como en condiciones potenciales. Similar respuesta se observó en los eventos transgénicos, TR1 y TR4 (Figura 5.1).

En el resto de las hojas (hojas Nro. 2, 3 y 4) en el año 2017 se obtuvo el mismo resultado que en el experimento del 2016 ya que el área foliar fue mayor en las hojas de plantas originadas de semillas con DHm en el ambiente materno. La segunda hoja generó un área

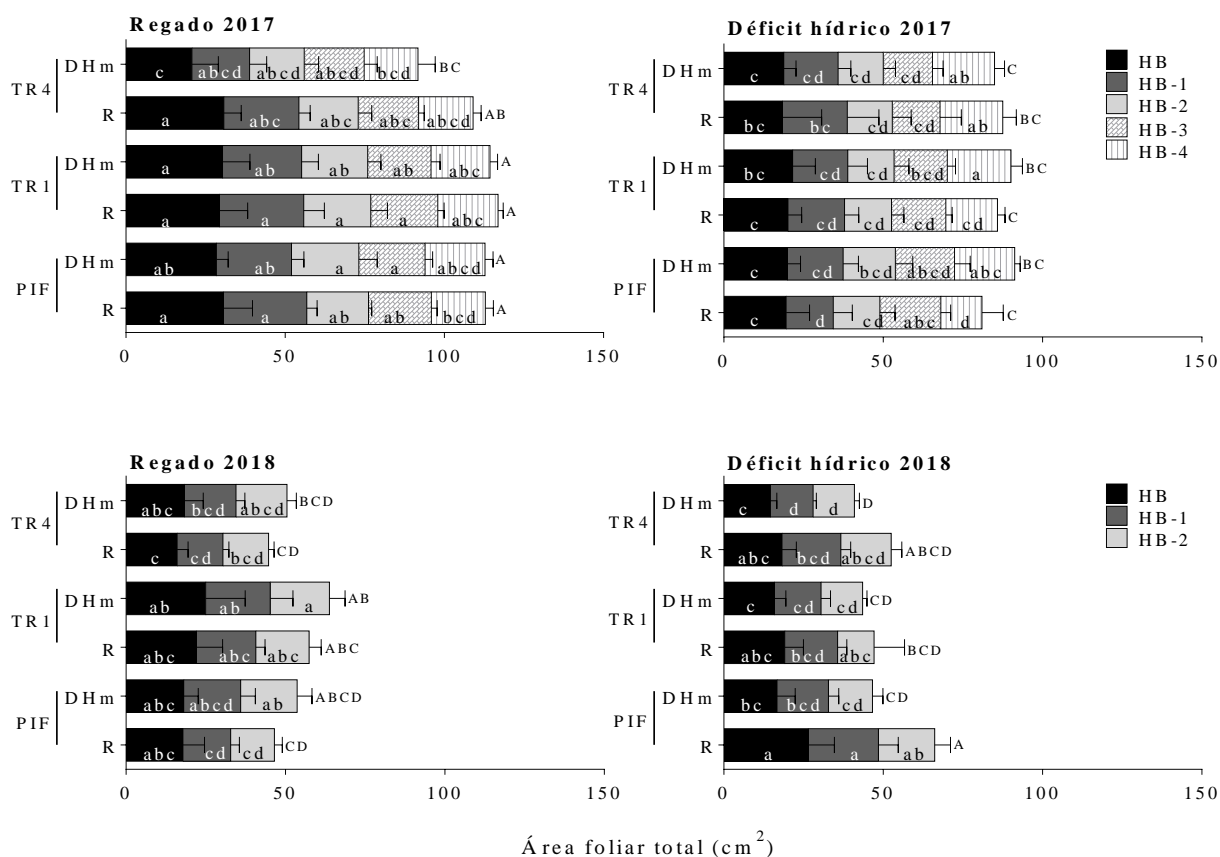
foliar mayor del 3%, 20% y 7% en PIF, TR1 y TR4, respectivamente. En la tercera hoja el PIF y el TR4 fue de un 4% mayor y en el TR1 de un 9%. Para el caso de la cuarta hoja todos los genotipos incrementaron en un 9% el área foliar (Figura 5.1).

En resumen, a partir de la segunda hoja hasta la cuarta hoja se observó un área foliar que tendió a ser mayor en la progenie de plantas que estuvieron expuestas a un DHm en el periodo crítico del cultivo (ambiente materno con DH).

En el experimento del año 2017 se midió hasta la cuarta hoja por debajo de la HB y en el experimento 2018 hasta la segunda. Es importante aclarar que el tratamiento impuesto de DH para estos experimentos se inició aproximadamente a partir de la expansión total de la HB-3 es decir en las últimas cuatro hojas expandidas (incluyendo la HB), por lo que las hojas que se expandieron totalmente dentro del estrés fueron la HB, HB-1 y HB-2 (Figura 5.2).

En el experimento 2017, el PIF de ambiente materno con DHm tuvo un área foliar ca.16% mayor en las hojas HB-1 y HB-2 y ca. 40% mayor en la HB-4 en el tratamiento con DH comparado con el regado. En el caso de la HB-3 no se observó diferencias en el área foliar entre ambas condiciones hídricas. El evento TR1 de ambiente materno con DHm mostró un incremento del 5% en el área foliar de la HB en cambio disminuyó un 3% en HB-1, HB-2 y HB-3 tanto en el tratamiento con DH como con riego (Figura 5.2).

En el caso del evento TR4, este no mostró incrementos en el área foliar como los genotipos anteriores. Más aún, el área foliar disminuyó ca. 24% en las progenies de ambiente materno con DHm respecto a las de ambiente materno con Rm en los estratos de hojas HB, HB-2, HB-3 y HB-4 independientemente del tratamiento de condición hídrica (Figura 5.2).



**Figura 5.2.** Área foliar verde en el vástago principal de la hoja bandera (HB) al momento de expansión total y las siguientes hojas por debajo de la misma (la HB-1 es la primera por debajo de la HB y así sucesivamente) de plantas correspondientes a la progenie de los genotipos PIF, TR1 y TR4 que se originaron en un ambiente materno con riego (Rm) y con déficit hídrico (DHm) en el período crítico. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) para cada hoja en particular (letras minúsculas) y para el área foliar total (letras mayúsculas) teniendo en cuenta las dos condiciones hídricas (Regado y Déficit hídrico) en cada año.

En el experimento del 2018, el PIF de ambiente materno con DHm sólo generó un aumento del área foliar del 24% en las hojas HB-1 y HB-2 dentro del tratamiento con riego. En forma similar, el TR1 tuvo un incremento del 13% en el área foliar en la HB-2 de la progenie de ambiente materno con DHm respecto con Rm. En cambio, el TR4 incrementó el área foliar en un 13% en todas las hojas (HB, HB-1 y HB-2) cuando estuvieron dentro del tratamiento con riego. Cuando el cultivo creció con DH todas las hojas disminuyeron el

área foliar en ca. 22% cuando se comparó plantas provenientes del ambiente materno con DHm respecto al con Rm.

#### *5.3.1.2 Biomasa aérea, rendimiento y componentes numéricos*

De los resultados obtenidos del experimento del año 2016, donde sólo se utilizó el genotipo PIF, se observó que el rendimiento en granos ( $\text{g m}^{-2}$ ) estuvo afectado significativamente por la condición hídrica ya que se redujo en ca. 43% ante un DH respecto a la condición con riego (Cuadro 5.1,  $p < 0,05$ ).

Dentro de cada tratamiento cuando se evaluó la respuesta del genotipo que difería en el ambiente materno en el cual que se generaron las semillas se observó que en la condición hídrica con riego, el rendimiento del PIF de ambiente materno con DHm disminuyó un 16% cuando se comparó con el proveniente de ambiente materno con riego (Rm). Por el contrario, cuando las plantas crecieron en una condición hídrica restrictiva las plantas provenientes de ambientes maternos con DHm incrementaron un 4% el rendimiento cuando se comparó con el regado (Rm). Sin embargo, dentro de cada condición hídrica no se observaron diferencias significativas ( $p \geq 0,05$ , Cuadro 5.1).



**Cuadro 5.1.** Rendimiento ( $\text{g m}^{-2}$ ), biomasa aérea ( $\text{g m}^{-2}$ ), índice de cosecha (IC), número de granos ( $\text{m}^{-2}$ ), y peso de mil granos (g) para las distintas condiciones hídricas actuales, genotipos y ambiente materno en el experimento 2016. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) por el Test LSD de Fischer.

2016							
Condición hídrica (CH)	Genotipo (G)	Ambiente materno (AM)	Rendimiento (g m <sup>-2</sup> )	Biomasa aérea (g m <sup>-2</sup> )	IC	Número de granos (m <sup>-2</sup> )	Peso de mil granos (g)
Regado	PIF	Rm	365,7 <sup>a</sup>	798,3 <sup>a</sup>	0,46 <sup>a</sup>	9439 <sup>a</sup>	39,7 <sup>ab</sup>
		DHm	308,7 <sup>a</sup>	695,0 <sup>a</sup>	0,44 <sup>a</sup>	7290 <sup>ab</sup>	42,7 <sup>a</sup>
Déficit hídrico	PIF	Rm	188,3 <sup>b</sup>	477,0 <sup>b</sup>	0,40 <sup>a</sup>	5281 <sup>b</sup>	35,3 <sup>b</sup>
		DHm	196,3 <sup>b</sup>	475,3 <sup>b</sup>	0,41 <sup>a</sup>	5273 <sup>b</sup>	37,3 <sup>ab</sup>
CH			***	***	ns	***	ns
CH×AM			ns	ns	ns	ns	ns

ns=diferencias no significativas; ns  $p \geq 0,05$ ; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

Los cambios en el rendimiento estuvieron explicados por las variaciones en la biomasa aérea ( $r^2 = 0,97$ ,  $p < 0,001$ ) donde el DH redujo el 37% de la biomasa comparado a la situación control. Dentro de la condición hídrica con riego la biomasa se redujo un 12% en la progenie de ambiente materno con DHm, aunque dichas diferencias no fueron significativas ( $p \geq 0,05$ ), mientras que en la condición con DH los cambios fueron menores al 1% no habiendo diferencias significativas ( $p \geq 0,05$ ; Cuadro 5.1). Dentro de cada condición hídrica a las que fueron expuestas las plantas el IC no mostró un efecto materno significativo ( $p \geq 0,05$ ; Cuadro 5.1).

El análisis de los componentes numéricos del rendimiento mostró que el número de granos por unidad de área fue el que explicó las mayores variaciones en el rendimiento, con cambios significativos asociados a la condición hídrica ( $p < 0,05$ , Cuadro 5.1). El número

de granos se redujo un 37% en la condición hídrica de DH comparado con la de riego (Cuadro 5.1,  $p < 0,05$ ). La comparación de este atributo dentro de cada condición hídrica asociada al ambiente materno mostró una tendencia similar a la observada en el rendimiento, ya que en el ambiente materno con DHm en las plantas de la progenie creciendo en condición hídrica con riego el número de granos disminuyó un 23% comparado con el origen de las semillas bajo riego, mientras que en la condición regado no se registraron cambios relativos importantes. De cualquier manera, al igual que lo observado en el rendimiento, no se registraron diferencias significativas dentro de cada condición de ambiente materno ( $p \geq 0,05$ , Cuadro 5.1). En cuanto al peso de los granos, el PIF de ambiente materno con DHm tendió a incrementar el peso de los granos ca. 6% tanto con DH como con riego, no registrándose cambios significativos entre ambas condiciones hídricas, así como tampoco entre los ambientes maternos dentro de cada condición hídrica (Cuadro 5.1).

En los resultados de los experimentos de los años 2017 y 2018 se incorporó al análisis a los eventos transgénicos (Cuadro 5.2 y 5.3). La condición con DH respecto a la condición de riego redujo significativamente el rendimiento ca. 60% y 53% en 2017 y 2018, respectivamente (Cuadro 5.2 y 5.3;  $p \geq 0,05$ ). El ambiente materno también generó una disminución en el promedio de los genotipos en ambas condiciones hídricas siendo estadísticamente significativo sólo en el año 2018. En términos generales, en todos los genotipos dentro de la condición hídrica con riego (con excepción el TR1 en la condición regado en 2018), las plantas provenientes de semillas de ambiente materno con DHm redujeron el rendimiento en un 11% en el experimento del 2017 y un 19% ( $p < 0,01$ ) en el 2018. Dentro de la condición con DH en cambio, las plantas provenientes de semillas de

ambiente materno con DHm aumentaron el rendimiento en un 10% ( $p \geq 0,05$ ) en el experimento del 2017 (con excepción del TRI en DH en 2017). Contrariamente a lo ocurrido en este experimento, en el experimento del año 2018 en la misma condición hídrica (DH) el ambiente materno con DHm disminuyó en un 24% ( $p < 0,01$ ) el rendimiento de los genotipos (Cuadros 5.2 y 5.3).

**Cuadro 5.2.** Rendimiento ( $\text{g m}^{-2}$ ), biomasa aérea ( $\text{g m}^{-2}$ ), índice de cosecha (IC), número de granos ( $\text{m}^{-2}$ ), y peso de mil granos (g) para las distintas condiciones hídricas, genotipos y ambiente materno en el experimento 2017. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) por el Test LSD de Fischer.

2017							
Condición hídrica(CH)	Genotipo (G)	Ambiente materno (AM)	Rendimiento (g m <sup>-2</sup> )	Biomasa aérea (g m <sup>-2</sup> )	IC	Número de granos (m <sup>-2</sup> )	Peso de mil granos (g)
Regado	PIF	Rm	252,7 <sup>a</sup>	498,9 <sup>ab</sup>	0,50 <sup>a</sup>	6647 <sup>a</sup>	38,3 <sup>abc</sup>
		DHm	240,9 <sup>a</sup>	493,6 <sup>ab</sup>	0,47 <sup>ab</sup>	6102 <sup>ab</sup>	39,5 <sup>a</sup>
	TR1	Rm	206,3 <sup>b</sup>	461,2 <sup>bc</sup>	0,42 <sup>abc</sup>	5290 <sup>bc</sup>	39,0 <sup>ab</sup>
		DHm	178,2 <sup>b</sup>	383,7 <sup>de</sup>	0,47 <sup>ab</sup>	4907 <sup>c</sup>	36,4 <sup>bcd</sup>
	TR4	Rm	237,1 <sup>a</sup>	560,4 <sup>a</sup>	0,37 <sup>bc</sup>	5593 <sup>bc</sup>	36,7 <sup>abcd</sup>
		DHm	205,5 <sup>b</sup>	539,5 <sup>a</sup>	0,43 <sup>abc</sup>	6783 <sup>a</sup>	34,9 <sup>d</sup>
Déficit hídrico	PIF	Rm	129,6 <sup>cd</sup>	387,2 <sup>d</sup>	0,33 <sup>c</sup>	3753 <sup>de</sup>	34,5 <sup>d</sup>
		DHm	140,5 <sup>c</sup>	417,4 <sup>cd</sup>	0,37 <sup>bc</sup>	3926 <sup>d</sup>	35,8 <sup>cd</sup>
	TR1	Rm	107,9 <sup>d</sup>	317,6 <sup>ef</sup>	0,33 <sup>c</sup>	2913 <sup>e</sup>	36,9 <sup>abcd</sup>
		DHm	41,3 <sup>e</sup>	238,0 <sup>gh</sup>	0,17 <sup>d</sup>	1293 <sup>f</sup>	31,0 <sup>e</sup>
	TR4	Rm	51,2 <sup>e</sup>	273,9 <sup>fg</sup>	0,20 <sup>d</sup>	1447 <sup>f</sup>	35,2 <sup>d</sup>
		DH	59,1 <sup>e</sup>	188,1 <sup>h</sup>	0,33 <sup>c</sup>	1607 <sup>f</sup>	36,9 <sup>abcd</sup>
CH			***	***	**	***	ns
G			***	**	*	***	**
G×CH			*	***	ns	**	ns
AM			ns	**	ns	ns	*
G×AM			***	*	*	**	***
CH×AM			ns	ns	ns	ns	ns
G×CH×AM			ns	ns	*	*	*

ns=diferencias no significativas; ns  $p \geq 0,05$ ; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

Con respecto a la biomasa aérea, se observó en ambos experimentos, tanto en el experimento del año 2017 como en el del año 2018, que cuando los cultivos fueron expuestos a una condición hídrica restrictiva se produjo una reducción en la biomasa aérea de ca. 38% respecto al control siendo esta reducción estadísticamente significativa en ambos experimentos (Cuadro 5.2 y 5.3;  $p \geq 0,05$ ).

El efecto que tuvo la condición del ambiente materno sobre la biomasa aérea fue similar al observado para el rendimiento siendo significativo ( $p < 0,05$ ) en ambos años experimentales. Además, los cambios en el rendimiento fueron explicados por variaciones en la biomasa aérea ( $r^2 = 0,90$ ,  $p < 0,05$ ) más que por cambios en el IC ( $r^2 = 0,30$ ,  $p \geq 0,05$ ). Con excepción del PIF en 2017 creciendo en DH y el TR1 creciendo en una condición regada en 2018, la biomasa aérea se redujo en ambos años y en ambas condiciones hídricas cuando las semillas de las plantas maternas estuvieron expuestas a una condición hídrica desfavorable (Cuadros 5.2 y 5.3). Sin embargo, al igual que lo observado en el rendimiento, las diferencias no fueron siempre significativas.

**Cuadro 5.3.** Rendimiento ( $\text{g m}^{-2}$ ), biomasa aérea ( $\text{g m}^{-2}$ ), índice de cosecha (IC), número de granos ( $\text{m}^{-2}$ ), y peso de mil granos (g) para las distintas condiciones hídricas, genotipos y ambiente materno en el experimento 2018. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) por el Test LSD de Fischer.

2018							
Condición hídrica (CH)	Genotipo (G)	Ambiente materno (AM)	Rendimiento (g m <sup>-2</sup> )	Biomasa aérea (g m <sup>-2</sup> )	IC	Número de granos (m <sup>-2</sup> )	Peso de mil granos (g)
Regado	PIF	Rm	596,3 <sup>a</sup>	1344,7 <sup>a</sup>	0,43 <sup>a</sup>	13966 <sup>a</sup>	42,7 <sup>a</sup>
		DHm	432,1 <sup>c</sup>	1075,0 <sup>c</sup>	0,40 <sup>ab</sup>	10553 <sup>c</sup>	40,9 <sup>a</sup>
	TR1	Rm	394,2 <sup>c</sup>	890,6 <sup>e</sup>	0,43 <sup>a</sup>	9210 <sup>d</sup>	42,8 <sup>a</sup>
		DHm	511,6 <sup>b</sup>	1220,0 <sup>b</sup>	0,40 <sup>ab</sup>	11861 <sup>b</sup>	43,1 <sup>a</sup>
	TR4	Rm	419,1 <sup>c</sup>	1051,1 <sup>cd</sup>	0,40 <sup>ab</sup>	9467 <sup>cd</sup>	44,2 <sup>a</sup>
		DHm	399,4 <sup>c</sup>	989,6 <sup>cde</sup>	0,40 <sup>ab</sup>	9277 <sup>d</sup>	43,1 <sup>a</sup>
Déficit hídrico	PIF	Rm	229,9 <sup>e</sup>	732,2 <sup>f</sup>	0,30 <sup>c</sup>	5096 <sup>f</sup>	44,9 <sup>a</sup>
		DHm	218,5 <sup>ef</sup>	634,2 <sup>fg</sup>	0,37 <sup>bc</sup>	4833 <sup>fg</sup>	45,2 <sup>a</sup>
	TR1	Rm	295,7 <sup>d</sup>	944,3 <sup>de</sup>	0,30 <sup>d</sup>	7295 <sup>e</sup>	40,7 <sup>a</sup>
		DHm	173,9 <sup>ef</sup>	595,7 <sup>g</sup>	0,30 <sup>d</sup>	3778 <sup>g</sup>	46,2 <sup>a</sup>
	TR4	Rm	210,0 <sup>ef</sup>	617,4 <sup>fg</sup>	0,33 <sup>cd</sup>	4602 <sup>fg</sup>	45,6 <sup>a</sup>
		DHm	166,5 <sup>f</sup>	560,3 <sup>g</sup>	0,30 <sup>d</sup>	4005 <sup>g</sup>	41,6 <sup>a</sup>
CH			***	***	**	***	ns
G			***	**	ns	***	ns
G×CH			*	**	ns	**	*
AM			**	**	ns	**	ns
G×AM			*	*	ns	*	ns
CH×AM			ns	**	ns	*	ns
G×CH×AM			***	***	ns	***	ns

ns=diferencias no significativas; ns  $p \geq 0,05$ ; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

Al analizar el IC, este atributo fue afectado por el tratamiento de DH dado que se redujo ca. 34% en el experimento del año 2017 y 22% en el experimento del año 2018 con diferencias estadísticamente significativas en ambos años ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, cuando se evaluó el ambiente materno este no mostró diferencias significativas en ninguno de los dos años para este atributo ( $p \geq 0,05$  Cuadros 5.2 y 5.3).

En cuanto a los componentes del rendimiento, se observó al igual que en el 2016, que el número de granos fue el componente que mejor explicó las variaciones en el rendimiento. El número de granos disminuyó un 56% ( $p < 0,05$ ) en ambos años cuando las plantas crecieron bajo DH comparadas con el control (Cuadro 5.2 y 5.3;  $p \geq 0,05$ ). El ambiente materno en este caso también fue similar al descripto para el rendimiento ya que el número de granos se redujo en un rango de 15% a 25% en el tratamiento con DH cuando el ambiente materno había tenido un DHm sin mostrar diferencias en el tratamiento con riego.

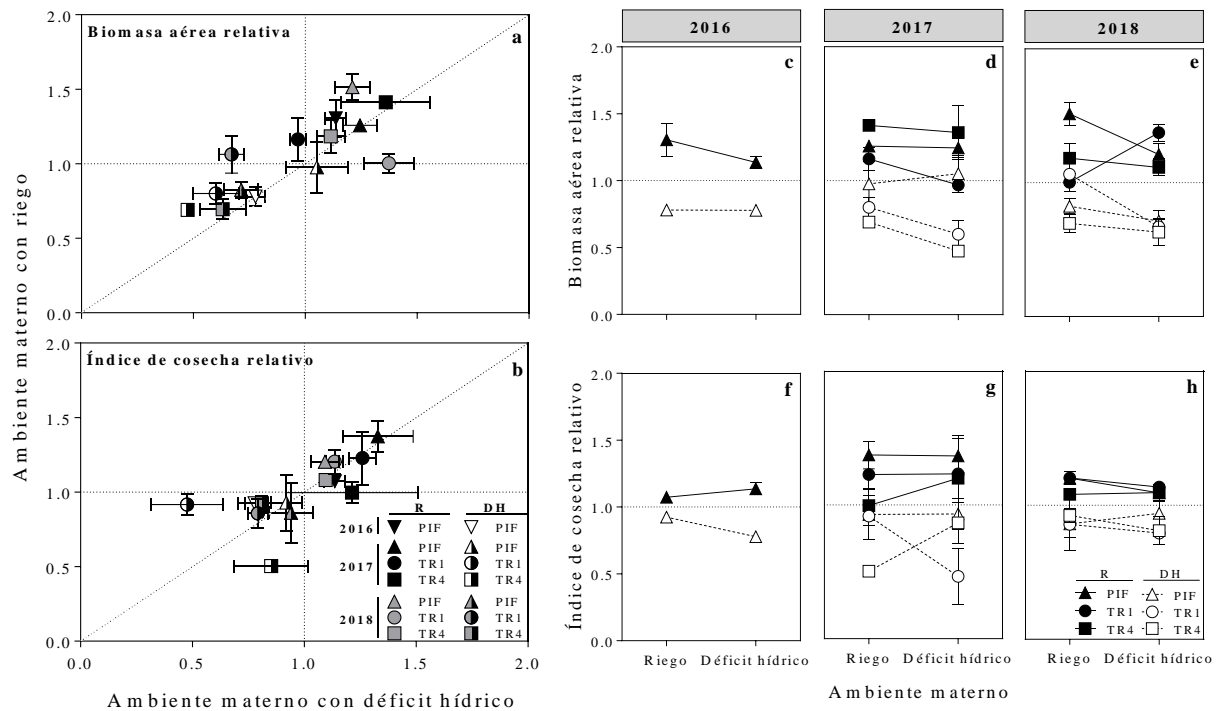
El peso de los granos, el otro componente principal del rendimiento, no se vio afectado por la condición ambiental en el experimento del año 2017 y en el experimento del año 2018 en la condición DH.

#### *5.3.1.3 Cambios en la biomasa aérea, rendimiento y componentes numéricos respecto a la media general del experimento*

A los efectos de visualizar más claramente las respuestas del efecto materno para los diferentes componentes del rendimiento, los datos se calcularon respecto de la media general de cada experimento. Esta aproximación permitió incluir en la misma figura todos los datos de los diferentes experimentos. En todos los experimentos realizados los genotipos que estuvieron dentro del tratamiento con riego incrementaron en algunos casos hasta un ca. 50% la biomasa aérea respecto a la media general del experimento tanto de ambiente materno con DHm como con riego. Por el contrario, cuando el tratamiento de condición hídrica fue con restricción, la biomasa del cultivo disminuyó alrededor de un ca. 25% tanto para el ambiente materno con riego como con DHm (Figura 5.3 a). La respuesta de cada uno de los genotipos dentro de cada año no fue consistente, pero sí lo fue en general la respuesta que tuvieron en base al ambiente materno al que pertenecen. Los

genotipos de ambiente materno con DHm generaron menor biomasa aérea que los genotipos de ambiente materno con Rm (Figura 5.3 c, d, e). A pesar de ello, como se mencionó anteriormente los que estuvieron en el tratamiento con riego se mantuvieron por encima de la media general del experimento y los del tratamiento con DH por debajo.

Similar comportamiento a la biomasa aérea tuvo el IC donde los genotipos creciendo bajo la situación con riego estuvieron por encima de la media general y los que estuvieron expuestos a un DH levemente por debajo (Figura 5.3 b, f, g, h). En el experimento del año 2017 hubo una respuesta diferencial entre los eventos transgénicos ya que el TR1 de ambiente materno con DH redujo en un ca. 50% el IC ante un DH, en cambio el TR4 lo incrementó (Figura 5.3 g).



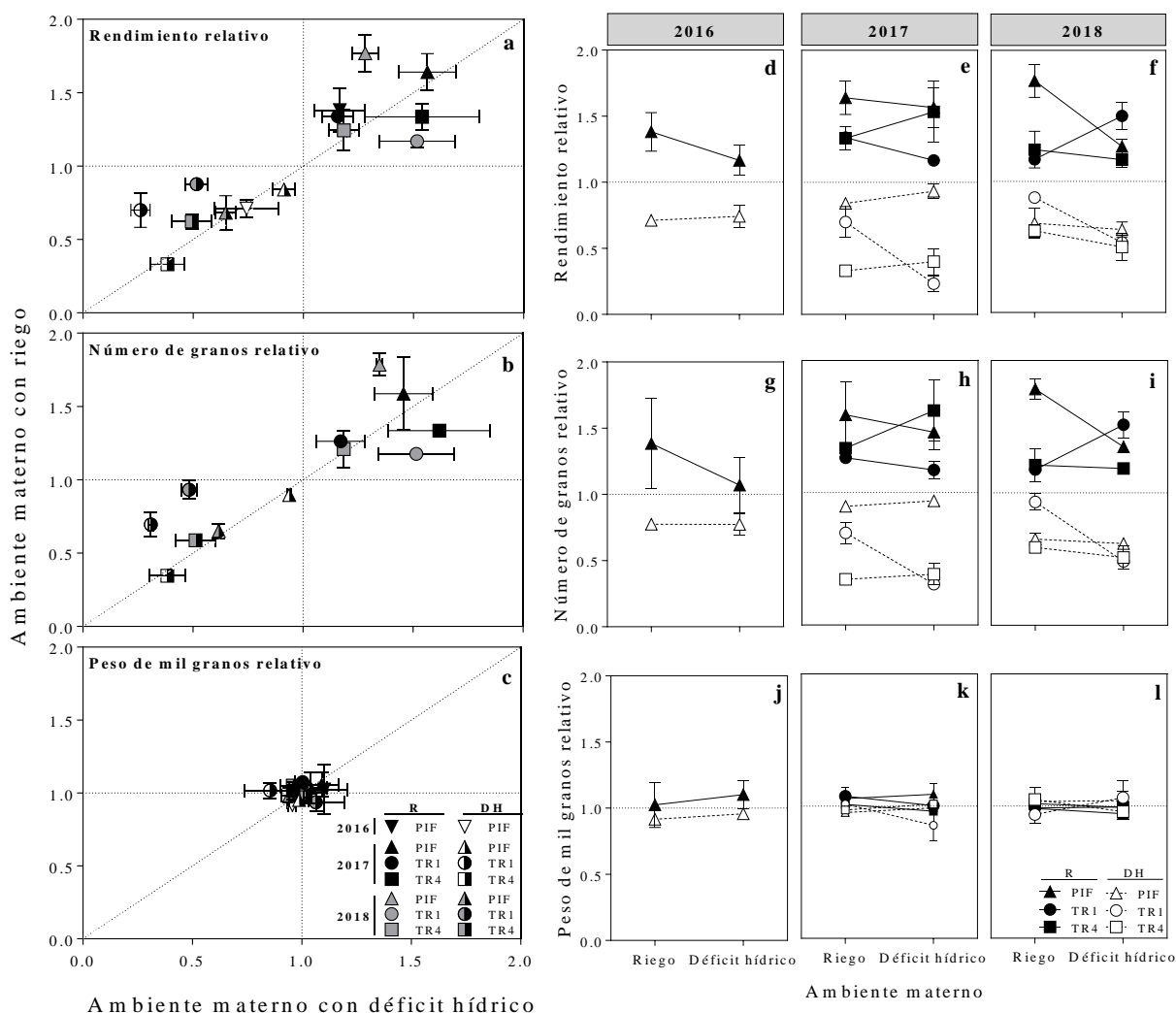
**Figura 5.3.** Respuesta de la biomasa aérea (a) y del índice de cosecha (b) de la progenie proveniente de ambiente materno con riego y ambiente materno con déficit hídrico cuando estuvieron en una situación con riego (R) y con déficit hídrico (DH) (panel izquierdo) y separando la respuesta de estos atributos para cada año de experimento 2016 (c, f), 2017 (d, g) y 2018 (e, h). A fin de poder comparar la respuesta de los genotipos con distinto ambiente materno, el valor de cada atributo se relativizó al promedio del correspondiente genotipo en todos los escenarios (i.e. dos condiciones hídricas con dos ambientes maternos contrastantes por condición hídrica). Cada punto (promedio de 3 repeticiones con su correspondiente error estándar) corresponde a PIF (triángulos), TR1 (círculos) y TR4 (cuadrados) con riego (símbolos llenos) o déficit hídrico (símbolos mitad vacíos) durante 2016 y 2017 (símbolos negros) o 2018 (símbolos grises).

El rendimiento en granos si bien respondió en forma similar a la biomasa aérea, este atributo fue más sensible con reducciones e incrementos más marcados ante condiciones hídricas contrastantes. Independientemente del ambiente materno del que provinieron las plantas, ante una condición hídrica con riego los genotipos incrementaron el rendimiento hasta más del 50% de la media general del rendimiento, mientras que ante un DH perdieron hasta el ca. 50% del rendimiento respecto de la media. En el caso puntual de TR1 y TR4 del experimento del 2017 ambos perdieron ca. 75% creciendo en la situación de DH cuando provienen de ambiente materno con DH y riego, respectivamente (Figura 5.4 a, d, e, f).



Dentro de la condición hídrica con riego, el PIF redujo su rendimiento cuando provenía de un ambiente materno con DHm en los tres años de experimento, mientras que ambos eventos transgénicos tuvieron respuestas contrastantes entre años para la misma condición hídrica. El TR1 en el experimento del año 2017 tuvo la misma respuesta que PIF, pero en el TR4 la respuesta fue inversa ya que incrementó el rendimiento alrededor de un ca. 25% cuando las plantas provinieron de ambiente materno con DHm y creciendo en condición de riego. Por el contrario, para el experimento del 2018, el PIF y el TR4 disminuyeron el rendimiento en el ambiente materno con DHm respecto con riego pero el TR1 lo incrementó alrededor de un 30% cuando ambos crecieron en una condición sin restricción hídrica (Figura 5.4. a, d, e, f). En el tratamiento con DH, el PIF no mostró diferencias entre los ambientes maternos de condición hídrica contrastante al igual que el TR4. Distinta fue la respuesta del TR1, el cual presentó una caída marcada del rendimiento cuando la descendencia provino de un ambiente materno con DHm (Figura 5.4. a, d, e, f).

El número de granos mostró la misma tendencia que el rendimiento cuando fueron comparados los valores respecto a la media general de cada experimento. Por otro lado, el peso de grano no se vio modificado en sus valores ante cambios en la condición hídrica y ambiente materno contrastante manteniéndose siempre dentro de la media general (Figura 5.4. b, g, h, i, c, j, k, l).

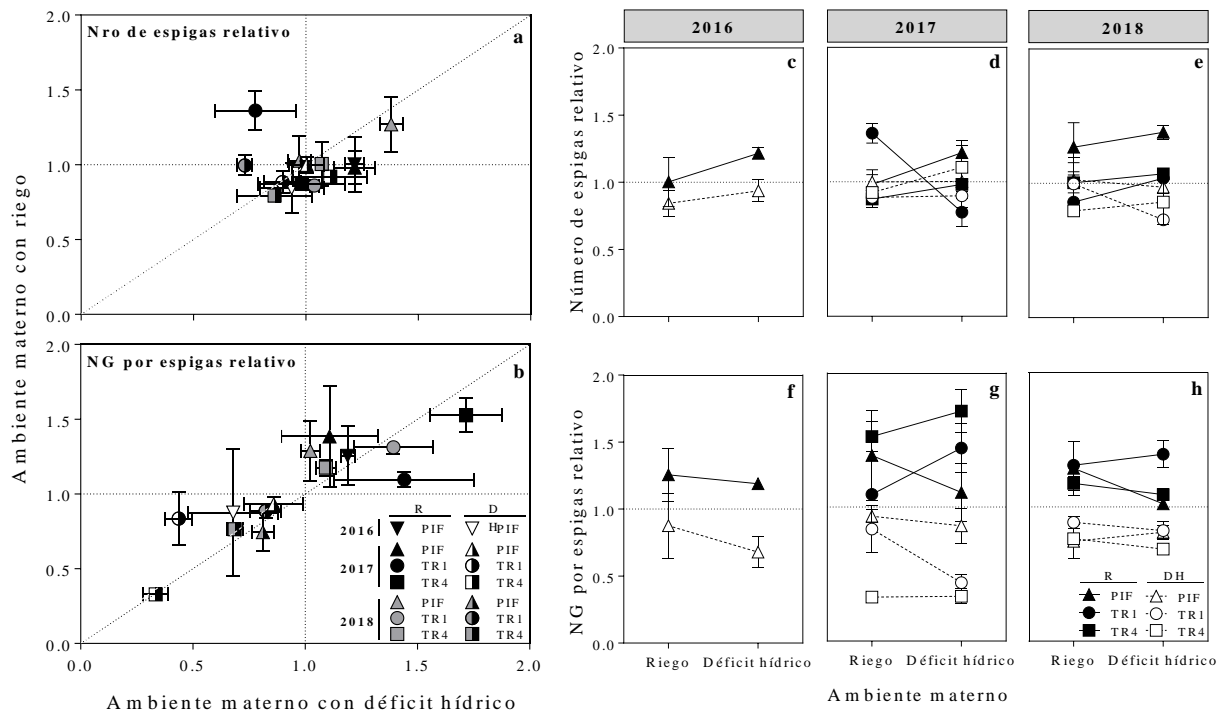


**Figura 5.4.** Respuesta del rendimiento (a), número de granos (b) y peso de grano promedio de progenies de ambiente materno con riego y ambiente materno con déficit hídrico cuando estuvieron en una situación con riego (R) y con déficit hídrico (DH) (panel izquierdo) y separando la respuesta de estos atributos para cada año de experimento 2016 (d, g, j), 2017 (e, h, k) y 2018 (f, i, l). A fin de poder comparar la respuesta de los genotipos con distinto ambiente materno, el valor de cada atributo se relativizó al promedio del correspondiente genotipo en todos los escenarios (i.e. dos condiciones hídricas con dos ambientes maternos contrastantes por condición hídrica). Cada punto (promedio de 3 repeticiones con su correspondiente error estándar) corresponde a PIF (triángulos), TR1 (círculos) y TR4 (cuadrados) con riego (R, símbolos llenos) o déficit hídrico (DH, símbolos mitad vacíos) durante 2016 y 2017 (símbolos negros) o 2018 (símbolos grises).

En base a la respuesta de los componentes principales del rendimiento, se analizó la respuesta de los sub-componentes como el número de espigas y el número de granos por espiga. En el caso del número de espigas por unidad de área, todos los genotipos en todos

los años se mantuvieron alrededor de la media general sin diferenciarse demasiado entre las condiciones hídricas con y sin estrés hídrico dado por el déficit. Este atributo en todos los casos, a diferencia de los atributos descriptos anteriormente, se incrementó ligeramente cuando el ambiente materno era con DHm. Sólo hubo dos excepciones, una en el experimento del año 2017 con el TR1, que cuando el cultivo creció en la condición de riego incrementó casi un 50% el número de espigas con ambiente materno con riego y disminuyó un ca. 25% cuando el ambiente materno era con DHmm. La otra excepción fue en el experimento del 2018 en el tratamiento con DH, donde también el TR1 disminuyó ca. 30% el número de espigas por  $m^2$  al provenir de ambiente materno con DHm (Figura 5.5. a, c, d, e).

El número de granos por espiga estuvo por encima de la media general cuando el tratamiento fue con riego y por debajo cuando fue con DH. Este atributo mostró un efecto de compensación con respecto al número de espigas dado que cuando se incrementó el número de estas, el número de granos por espiga disminuyó y así viceversa (Figura 5.5. b, f, g, h).



**Figura 5.5** Respuesta del número de espigas (a), número de granos por espigas (b) de la progenie de ambiente materno con riego y ambiente materno con déficit hídrico cuando estuvieron en una situación con riego (R) y con déficit hídrico (DH) (panel izquierdo) y separando la respuesta de estos atributos para cada año de experimento 2016 (c, f), 2017 (d, g) y 2018 (e, h). A fin de poder comparar la respuesta de los genotipos con distinto ambiente materno, el valor de cada atributo se relativizó al promedio del correspondiente genotipo en todos los escenarios (i.e. dos condiciones hídricas con dos ambientes maternos contrastantes por condición hídrica). Cada punto (promedio de 3 repeticiones con su correspondiente error estándar) corresponde a PIF (triángulos), TR1 (círculos) y TR4 (cuadrados) con riego (R, símbolos llenos) o déficit hídrico (DH, símbolos mitad vacíos) durante 2016 y 2017 (símbolos negros) o 2018 (símbolos grises).

## 5.4 Discusión

Los experimentos del presente Capítulo fueron diseñados para evaluar si las plantas que portan el transgén  $P_{SARK::IPT}$  y las plantas control no transgénicas presentaban alguna herencia transgeneracional de adaptación ambiental cuando fueron expuestas a condiciones de oferta hídrica contrastantes. En general, la condición hídrica en las que crecieron las plantas (déficit hídrico y riego) determinó las mayores diferencias entre los genotipos. De este modo, en promedio los genotipos que crecieron en una condición de déficit hídrico, independientemente de la condición materna, redujeron el rendimiento ca. 57% y la

biomasa ca. 38%. Cuando se observó la respuesta del ambiente materno sobre el rendimiento, en términos generales (con la excepción del año 2016) las plantas provenientes de ambientes maternos con DHm mostraron reducciones en rendimiento (en promedio 15%), respecto de aquellas provenientes de ambientes maternos regados, cuando crecieron en una condición hídrica desfavorable. Cuando las plantas crecieron en condiciones favorables, la penalización en aquellas plantas provenientes de semillas expuestas de ambiente materno con déficit hídrico fue en promedio sustancialmente menor (i.e. 7%). En resumen, plantas provenientes de semillas expuestas a una mejor condición materna se comportaron más favorablemente cuando crecieron en ambientes de déficit hídrico (DHm). En línea con estos resultados, algunas evidencias de la literatura muestran que las progenies de plantas de trigo expuestas a un déficit hídrico en la etapa vegetativa (séptima hoja y novena hoja) y siete días después de antesis redujeron el rendimiento ca. 9% ante un estrés hídrico cuando se comparó con una situación control (sin déficit) (Wang et al., 2016). En el mismo sentido, Wang et al (2018) en un experimento en microcultivo donde se utilizaron semillas provenientes de plantas que estuvieron expuestas a siete días de déficit hídrico alrededor de antesis, cuando su progenie estuvo expuesta a similar estrés hídrico que las semillas provenientes de la planta madre, el rendimiento fue reducido ca. 11% cuando fue comparado con semillas provenientes de la planta madre sin estrés. Otras evidencias en cebada mostraron que la progenie de plantas con estrés generado por un déficit hídrico de 14 días a partir de hoja bandera redujo el rendimiento en un ca. 12% respecto del control (i.e. semillas provenientes de plantas sin déficit hídrico) cuando crecieron en condiciones de déficit hídrico alrededor de floración (i.e. aparición de aristas). Sin embargo, a diferencia de lo que en promedio fue observado en la presente tesis, otros

trabajos demostraron efectos positivos en el rendimiento en la progenie de plantas cuyas semillas provinieron de plantas sometidas a estrés alrededor de anthesis. En este sentido, Zhang et al. (2016) describieron un incremento del 10% en rendimiento en la progenie de plantas de trigo que tuvieron un déficit hídrico inmediatamente luego de anthesis (durante 7 días), cuando la misma progenie creció bajo las mismas condiciones. Esta controversia entre las evidencias en la literatura son también observadas entre el experimento del año 2016 con los experimentos del año 2017 y 2018, que probablemente tenga que ver con la distintas combinaciones de factores ambientales y mecanismos estimulados dentro de la planta que les permite detectar y responder al entorno de forma tal que condiciona al desarrollo de su progenie (Trewavas, 2003; Trewavas, 2005; Sadras, 2007; Chinnusamy y Zhu, 2009; Valverde, 2011).

En relación con los componentes numéricos, el número de granos siguió la misma tendencia que el rendimiento mostrando entonces el mismo patrón de respuesta en todos los experimentos. Por otro lado, las variaciones registradas en el peso de los granos en todos los experimentos fueron muy pequeñas comparadas a las modificaciones en número de grano. Esto va en línea con lo que se ve en la literatura donde en todas las fuentes de variación ambiental y genotípica, el rendimiento está totalmente condicionado por variaciones en el número de granos más que por variaciones en el peso de granos ante un estrés ambiental (Siddique et al., 1989; Annicchiarico y Pecetti, 2003, del Moral et al., 2003; Lopez-Bellido et al., 2005; Giunta et al., 2007; Acreche et al. al., 2008; Cossani et al., 2009; Cossani et al., 2011, Sadras et al., 2012).

Considerando los subcomponentes del número de granos, el número de espigas mostró una respuesta conservativa ya que el ambiente materno no produjo modificaciones

relevantes en este atributo. El trabajo reportado por Zhang et al (2016) muestra que el número de espigas por planta se incrementó levemente en la progenie de plantas sometidas a estrés hídrico cuando crecieron bajo la misma condición, mostrando compensaciones en el número de granos por espiga el cual se redujo. Sin embargo, otras evidencias demuestran que las reducciones en el rendimiento se asociaron con disminuciones similares en el número de espigas por planta ya que cuando la progenie creció bajo condiciones restrictivas de agua, el número de espigas presentó variaciones similares (ca. 11%) respecto de los cambios en el rendimiento, sin que se observaran cambios de relevancia en el número de granos por espiga (Wang et al., 2018).

En relación con los efectos sobre el peso de los granos, hay varias evidencias en la bibliografía que muestran que el tamaño de la semilla puede estar afectado por la condición ambiental, donde ambientes restrictivos generan granos de menor tamaño, pudiendo afectar el tamaño de las hojas preformadas (Jones, 1994; Yang y Zhang, 2010). Debido a que en la etapa embrional se generan distintos órganos dentro de los cuales se encuentran los primeros primordios de hojas (hojas preformadas), en los granos de menor tamaño, con un embrión más pequeño, es posible que las hojas preformadas en el embrión presenten un tamaño menor (menor IAF) (AddaePearson, 1992; Robert y Stogarda, 2004; Singh y Singh, 2003; Mohsen et al., 2011, Altenbach, 2012). En este capítulo se evaluó el área foliar de las primeras cuatro hojas como parámetro para determinar diferencias entre semillas de ambiente materno con déficit hídrico con semillas de ambiente materno en condiciones potenciales. En base al resultado se determinó que la primera hoja no presentaba diferencias entre ambiente maternos contrastantes y a partir de la segunda hoja hasta la cuarta hoja se observó un área foliar con una tendencia a ser mayor en la progenie

de plantas que estuvieron expuestas a un déficit hídrico en el periodo crítico del cultivo. Así los resultados obtenidos en este capítulo no muestran una reducción en el tamaño de las hojas preformadas en el embrión que se desarrolló en ambientes de condición hídrica restrictivas por lo que la capacidad de interceptación de radiación en las primeras etapas del cultivo en plantas proveniente de progenie sometidas a condiciones de estrés hídrico no debería verse afectada ya que no se detectaron diferencias en el tamaño del área foliar de estas hojas.

## **5.5 Conclusión**

Los eventos transgénicos tanto TR1 y TR4 junto con el PIF se comportaron de manera similar en la respuesta de herencia transgeneracional, en la cual no mostraron una adaptabilidad inducida por déficit hídrico en el ambiente materno que le permita a la progenie tener ventajas en una condición restrictiva como era esperable. En términos generales las progenies provenientes de condiciones sin restricciones hídricas mostraron una mejor performance en su rendimiento cuando fueron sembradas tanto en condiciones de riego como en condiciones con deficiencias hídricas. Consistentemente con los resultados descritos a lo largo de esta tesis las variaciones en los rendimientos fueron asociadas a cambios en el número de granos más que a variaciones en el peso de estos.



## CAPÍTULO 6

---

### DISCUSION GENERAL

En este capítulo se realiza la discusión de los principales resultados obtenidos a partir de la investigación realizada en esta tesis en el contexto de la problemática abordada. Esto permitirá poner de manifiesto la relevancia de los hallazgos como aporte al estado actual del conocimiento sobre el tema y las consideraciones acerca de las posibles aplicaciones.

#### 6.1 Introducción

Como fue descripto en los capítulos anteriores, y a manera de resumen, el estrés hídrico tanto por excesos como por déficit hídricos reduce el rendimiento del cultivo de trigo (*Triticum aestivum* L.). Si bien el rendimiento está definido por el número de granos y el peso de los granos, el número de granos por unidad de área es el componente de rendimiento que mejor explica los cambios en el rendimiento (Fischer, 1985; Slafer y Andrade, 1993; Slafer et al., 1994; Miralles et al., 1998; Miralles y Slafer, 1999; Borrás et al., 2004; Shearman et al., 2005; Sánchez-García et al., 2013). Cualquier estrés hídrico que ocurra durante el periodo crítico para la definición del rendimiento reducirá la tasa de crecimiento de las espigas y su peso final, y por lo tanto redundará en un menor número de granos por espiga y un menor rendimiento (Setter et al., 1999; Hoffman et al., 2008, Araki et al., 2012; de San Celedonio et al., 2014). Además, dichos estreses producen un incremento en la senescencia foliar, la cual está regulada por la expresión coordinada de genes específicos, que reduce la capacidad de intercepción de radiación (Buchanan-

Wollaston, 1997; Chandlee, 2001; Yoshida, 2003; Lim, et al. 2007; Farooq et al., 2009; Mittler y Blumwald, 2010). La transgénesis es una de las opciones que se está utilizando últimamente para mejorar la tolerancia de las plantas a condiciones ambientales desfavorable y que provee una respuesta prometedora para mitigar los efectos negativos del estrés hídrico.

Para generar líneas transgénicas en trigo una de las vías utilizada ha sido el método biolístico a través del cual se realiza la inserción de ADN foráneo dentro del genoma de la célula vegetal (Vasil et al., 1992; Vasil et al., 1993; Semanas et al., 1993; Nehra et al., 1994; Zhou et al., 1995; Alpeter et al., 1996; Ortiz et al., 1996; Takumi et al., 1996; Barro et al., 1998; Yao et al., 2006; Kovalchuk et al., 2009; Ismagul et al., 2014; Zhang et al., 2014). Si bien el método biolístico es una herramienta útil para la incorporación del ADN foráneo, su aplicación puede resultar en la inserción de múltiples copias de manera indiscriminada no siendo este aspecto deseable (Sparks y Jones, 2004) ya que pueden conducir al silenciamiento génico de los transgenes, a la expresión aberrante de los transgenes en las generaciones posteriores e incluso a la pérdida de los mismos (Van der Krol et al., 1990; Hobbs et al., 1993; Srivastava et al., 1996; Stoger et al., 1998; Kohli et al., 1999; Pellegrineschi et al., 2002; Kohli et al., 2003; Baulcombe, 2004; Sparks y Jones, 2004; Agrawal et al., 2005; Jones, 2015). Las plantas transgénicas con insertos de copia única o de bajo número de copias se ven menos afectadas por estos problemas, y por lo tanto son deseables para estudios genómicos funcionales (Jones, 2005; 2015). En la presente tesis se realizó la transgénesis de trigo usando el constructo P<sub>SARK</sub>::IPT el cual estaba formado con el gen que codifica para la enzima adenosina fosfato isopenteniltransferasa (IPT) aislado de *Agrobacterium tumefaciens* bajo el control transcripcional del promotor específico asociado

a la senescencia (SAGs) denominado Receptor proteína-Kinasa Asociado a la Senescencia (SARK, Hajouj et al., 2000) con evidencias en monocotiledóneas y dicotiledóneas (Rivero et al., 2007; Rivero et al., 2009; Peleg et al., 2011; Qin et al., 2011; Oneto et al., 2016). La enzima codificada por el gen *ipt* tiene como función catalizar el paso limitante en la ruta de biosíntesis de citoquininas (Akiyoshi et al., 1984; Barry et al., 1984). Por ello, la sobreexpresión de este gen provoca un aumento de los niveles endógenos de citoquininas respecto a las plantas control, reduciendo la senescencia foliar e induciendo la tolerancia a estreses que aceleran la senescencia (Howell et al., 2003).

Por otra parte, los estudios ecofisiológicos a nivel de planta individual pueden generar respuestas a los tratamientos que no necesariamente representan lo que ocurre cuando se trabaja a nivel de canopeo (Cox y Cochrab, 1946; Pedró et al., 2012). La dificultad de traducir los beneficios observados en ambientes controlados hacia condiciones de campo ha sido la principal dificultad para el éxito a nivel productivo de plantas transgénicas tolerantes al estrés hídrico (Passioura, 2012). Las plantas tienen la posibilidad de modular la respuesta cuando frente a cambios ambientales (Hirayama et al., 2010) generan variaciones fenotípicas que modulan la adaptabilidad de un cultivo a cambios medioambientales de corto y largo plazo, que pueden ser transmitidas a su descendencia. Esta variación fenotípica puede estar dada por la variación epigenética, donde el mismo genotipo puede mostrar fenotipos alternativos sin modificar la secuencia de nucleótidos y controlar la regulación de la expresión génica (Richards, 2006). Por lo tanto, cambios en las condiciones ambientales pueden inducir cambios significativos en las marcas epigenéticas que pueden desempeñar un papel importante en las respuestas plásticas al ambiente

(Mirouze y Paskowsko, 2011; Richards et al., 2011), y que han sido particularmente estudiadas en la respuesta de las plantas al estrés ambiental (Bruce et al., 2007).

En contexto a la problemática abordada, esta tesis tuvo como objetivo general *“caracterizar el comportamiento ecofisiológico de trigos transgénicos transformados con la secuencia del transgén IPT bajo la regulación del promotor SARK.”*

## **6.2 Avances en el conocimiento a partir de la presente tesis**

Para lograr el objetivo principal de la presente tesis y poder abordar la problemática presentada se siguieron tres objetivos específicos. El primer objetivo fue *“Caracterizar el rendimiento y sus atributos fisiológicos (biomasa, índice de cosecha, peso y número de granos, etc.) en plantas de trigo transformadas con el transgén  $P_{SARK}::IPT$  y compararlas con plantas control frente a restricciones y excesos hídricos durante el periodo crítico del cultivo”*. En primer término se evaluaron las plantas transgénicas a una escala de planta individual (Capítulo 3) y luego se pasó a una escala de cultivo (Capítulo 4). Los resultados del Capítulo 3 mostraron que los trigos transgénicos no presentaron diferencias en la fenología respecto al genotipo control (PIF), indicando que la transgénesis no afectó ni interactuó con ninguno de los genes de adaptación que controlan la fenología del cultivo (i.e. fotoperiodo -Ppd-, Vernalización -Vrn- y *earliness per se* -Eps-), presentando un fenotipo similar. Bajo la situación control (sin restricciones) los genotipos transgénicos no evidenciaron penalización en el rendimiento ni en sus componentes numéricos (número de granos por planta, peso del grano) y fisiológicos (biomasa total, índice de cosecha). Sin embargo, y a diferencia de lo esperado inicialmente a partir de las evidencias de Belznec

(2018), cuando los genotipos transgénicos se expusieron a una condición de estrés hídrico, en términos generales, no mostraron diferencias significativas en rendimiento respecto del genotipo control, aunque tuvieron una leve tendencia a mantener la biomasa aérea bajo situaciones de estrés. En las condiciones evaluadas en esta tesis no se observaron cambios en el área foliar verde y tampoco se observaron retrasos en la senescencia en las plantas transgénicas respecto del control, a pesar de que el análisis molecular realizado permitió constatar que todas las plantas transgénicas mantenían la expresión del transgén ante el estrés hídrico. Del mismo modo, no se observaron diferencias en el contenido de nitrógeno foliar (cuantificado a través del índice de verdor SPAD). Estos resultados contrastan con otras evidencias de la literatura en especies tales como tabaco, arroz y maíz en las que se ha demostrado que plantas que expresan el transgén  $P_{SARK::IPT}$  muestran un efecto significativo en el retraso de la senescencia, lo que se traduce en un mayor área foliar verde en el tiempo (Rivero et al., 2007; 2009; Peleg et al., 2011; Reguera et al., 2013; Oneto et al., 2016).

En cuanto al rendimiento en granos hubo respuestas disímiles entre los eventos transgénicos  $P_{SARK::IPT}$  ya que mientras el evento TR1 no mostró diferencias estadísticamente significativas en rendimiento en granos respecto del genotipo control tanto en la condición hídrica controlada como en las condiciones hídricas desfavorables, el TR4 registró una penalización en el rendimiento tanto en el control como en déficit hídrico sin mostrar diferencias estadísticamente significativas en la condición con exceso hídrico. Tal como fue indicado anteriormente, estos resultados contrastan con las evidencias reportadas en arroz y maíz donde las plantas transgénicas  $P_{SARK::IPT}$  mostraron ventajas significativas en el rendimiento en granos respecto a las plantas control (Peleg, 2011; Oneto et al., 2016).

Algunas hipótesis asociadas a la falta de respuesta observadas en el marco de esta tesis en los eventos transgénicos son discutidas en esta sección.

Los resultados del Capítulo 4, cuando los materiales se condujeron en condiciones de campo, mostraron resultados consistentes con lo descrito en el capítulo anterior (Capítulo 3), ya que las plantas de trigo transgénico  $P_{SARK::IPT}$  en general tuvieron un comportamiento estadísticamente similar al control sin manifestar diferencias significativas en la biomasa aérea ni penalizaciones en el rendimiento tanto en la condición hídrica con riego como de secano. Sin embargo, bajo estas condiciones de campo el trigo transgénico tendió a obtener valores de rendimiento por encima del trigo no transgénico cuando exploraron condiciones restrictivas, siendo estas diferencias estadísticamente significativas respecto al genotipo control sólo en uno de los sitios. Cabe señalar que los resultados en condiciones de campo si bien se llevaron a cabo con los mismos genotipos, estos experimentos fueron conducidos con una selección de plantas en base a la mejor performance de rendimiento dentro de cada evento transgénico, a los efectos de seleccionar los materiales que mejor comportamiento tuvieron en condición de secano (ver Capítulo 4).

En base a los resultados obtenidos, no se rechaza la primera hipótesis planteada: “*En condiciones potenciales (sin restricciones hídricas ni nutricionales) los genotipos de trigo que expresan la secuencia  $P_{SARK::IPT}$  no penalizan en la producción de biomasa ni en el rendimiento alcanzado cuando son comparados con el control no transgénico*”. Las respuestas obtenidas dentro de la situación control en la producción de biomasa aérea y rendimiento permite aceptar la primera hipótesis planteada. En cambio los resultados llevan a rechazar la segunda hipótesis planteada: “*Genotipos de trigo que expresan la secuencia  $P_{SARK::IPT}$  expuestos a estreses abióticos (i.e restricciones y excesos hídricos) penalizan en*

*menor medida el rendimiento respecto del control no transgénico debido a un retraso en la senescencia foliar, permitiendo una mayor producción de biomasa y por ende un mayor rendimiento”* dado que las plantas de trigo transgénicos no mostraron retrasos en la senescencia y por ende este proceso fisiológico no permite inferir que condicionó la producción de la biomasa aérea y el rendimiento. También se rechaza la tercer hipótesis planteada: *“Plantas de trigo que expresan la secuencia  $P_{SARK}::IPT$  presentan durante y después del periodo de imposición del estrés mayor contenido de nitrógeno foliar (cuantificado mediante el verdor SPAD) en comparación con plantas control”* dado que las mediciones de SPAD no dieron evidencias de que el contenido de N foliar sea diferente entre las plantas de  $P_{SARK}::IPT$  con las plantas control.

A pesar de no observarse diferencias significativas en el rendimiento, los genotipos transgénicos demostraron una mayor capacidad en tolerar el estrés por déficit o por exceso en el atributo número de granos, aunque en cada tipo de estrés no hubo consistencia en cual fue el evento transgénico (TR1 o TR4) que resultó más favorable. Por otro lado, las respuestas favorables en el número de granos fueron compensadas por reducciones en el peso de los granos, lo que determinó que en numerosas oportunidades no se observaran diferencias en el rendimiento como fue indicado anteriormente. La compensación entre los componentes numéricos del rendimiento es una problemática común en el cultivo de trigo y explica por qué no es posible escalar a nivel de cultivo cambios particulares que se observan en un órgano específico (Slafer, 2003). Estos resultados permiten rechazar la cuarta hipótesis: *“Restricciones y excesos hídricos reducen el rendimiento en menor magnitud en las plantas de trigo que expresan la secuencia  $P_{SARK}::IPT$ , respecto de las plantas control, debido a una menor reducción en el número de granos por planta y por*

*unidad de área. No se esperan cambios en el peso de los granos”* dado que ante excesos hídricos los trigos transgénicos mostraron incrementos en el peso de los granos.

EL segundo objetivo de la tesis fue: *“Analizar la partición entre la biomasa aérea y radical en plantas transformadas con el transgén  $P_{SARK}::IPT$  (y su comparación con los controles) en respuesta a restricciones y exceso hídricos en el periodo crítico”*. En este sentido, los resultados de la tesis mostraron que el estrés hídrico, ya sea por déficit como por exceso, produjo una disminución en la proporción de biomasa radical más marcada que en la de biomasa aérea; sin embargo, el anegamiento fue la situación donde la disminución de la partición radical:aérea fue de mayor magnitud y significativa, en línea con lo observado por de San Celedonio et al. (2017, 2018). Debido a que la comparación entre genotipos no mostró diferencias estadísticamente significativas dentro de cada tratamiento, se rechaza la quinta hipótesis *“Las plantas de trigo que expresan la secuencia  $P_{SARK}::IPT$  presentan una mayor partición a raíces tanto en términos absolutos como relativos respecto de las plantas control cuando son expuestas a condiciones hídricas estresantes”*.

El tercer objetivo y último abordado en la tesis fue: *“Evaluar si las plantas que portan el transgén  $P_{SARK}::IPT$  y las plantas control no transgénicas presentan alguna herencia transgeneracional de adaptación ambiental”*. En este aspecto los resultados mostraron que en términos generales, y a diferencia de lo que indica la literatura, la progenie que provino de semillas donde las plantas maternas tuvieron una mejor condición hídrica mostraron una mejor performance en cualquiera de los ambientes en los que se desarrollaron. Por el contrario, las plantas provenientes de semillas de progenie que fueron sometidas a estrés hídrico penalizaron el rendimiento en la mayoría de los ambientes. Si bien estas evidencias no están en línea con algunos trabajos publicados en la literatura donde las plantas que

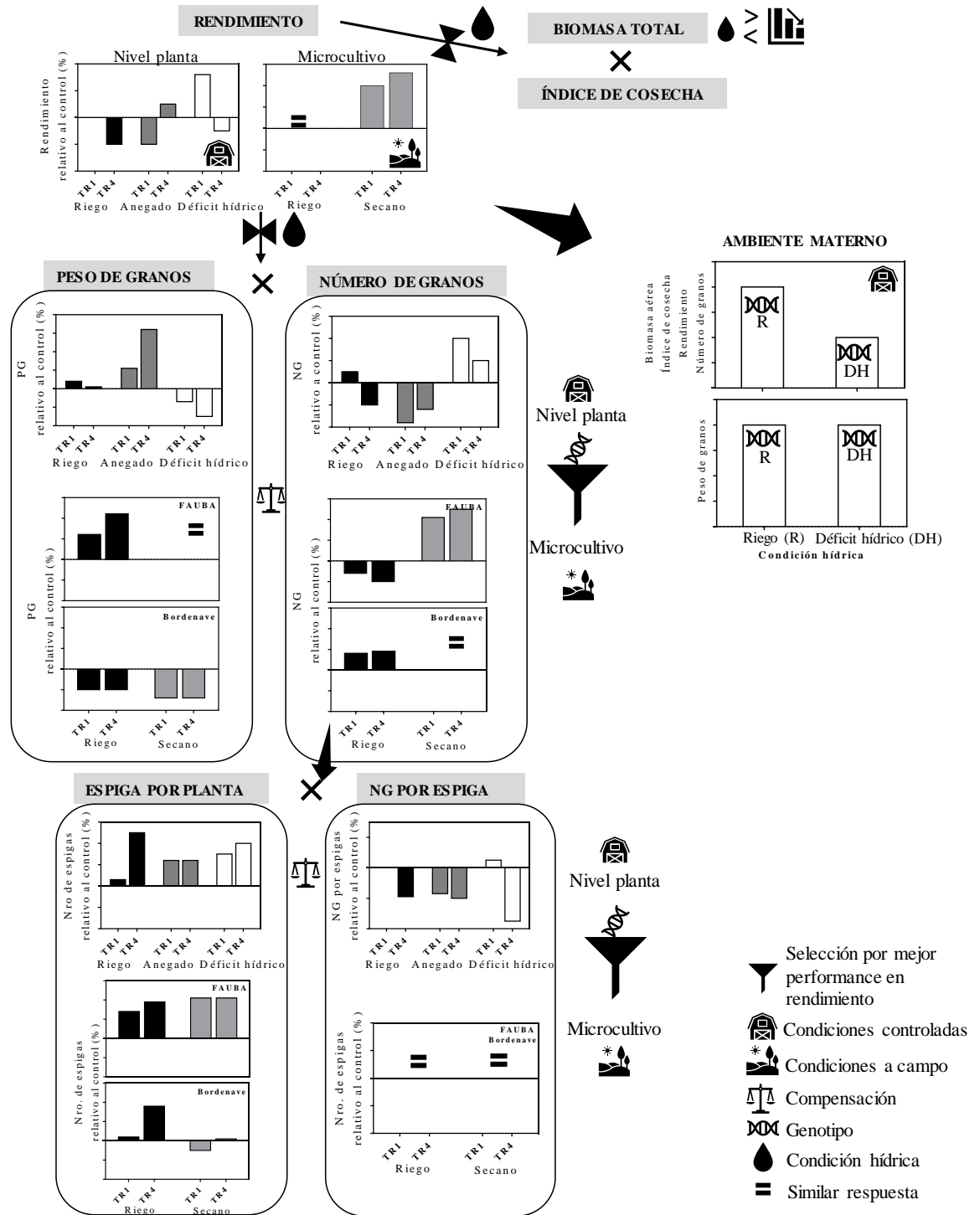


fueron sometidas a estrés hídrico en la planta madre se comportaron mejor en ambientes restrictivos (tal lo discutido en el Capítulo 5), es posible afirmar que se observó adaptabilidad inducida por el ambiente. Así, estas evidencias permiten no rechazar la última y sexta hipótesis planteada: *“Las plantas de trigo que expresan la secuencia  $P_{SARK::IPT}$  presentan herencia transgeneracional de adaptación ambiental, lo que le da una performance distinta dependiendo del estímulo ambiental en las que se originó las semillas”*.

### **6.3 Efectos más relevantes del transgén $P_{SARK::IPT}$ en el genoma de trigo**

En la Figura 6.1 se presenta un modelo conceptual donde se resumen los cambios en el rendimiento en grano y sus componentes numéricos y fisiológicos de los eventos transgénicos respecto al genotipo control ante condiciones hídricas contrastantes y diferente ambiente materno.

Los trigos transgénicos no manifestaron efectos contraproducentes atribuibles al transgén  $P_{SARK::IPT}$  ya que se comportaron de manera fenotípicamente similar a su genotipo control en la condición sin restricción. Sin embargo, como fue descrito anteriormente, no hubo un efecto claro en las ventajas de la introgresión del transgén tanto en condiciones restrictivas como en condiciones controladas ya que a nivel de planta no se observaron ventajas, pero a nivel de microcultivo se observó un mayor rendimiento por unidad de área en condiciones de campo cuando la condición hídrica fue de secano (Figura 6.1). La falta de respuesta en el rendimiento en condiciones controladas desde el punto de vista de los componentes del rendimiento está asociadas a compensaciones entre los componentes numéricos (i.e. peso y número de grano) (Figura 6.1).



**Figura 6.1.** Esquema simplificado de la respuesta en el rendimiento y componentes numéricos y fisiológicos de los eventos transgénicos respecto al genotipo control a diferente disponibilidad hídrica en condiciones controladas (nivel planta individual), a campo (microcultivo) y distinto ambiente materno (microcultivo).

Por otro lado, un aspecto importante que puede explicar la falta de consistencia entre las respuestas observadas en condiciones controladas y a campo podría estar vinculada con el número de copias que tenían cada uno de los eventos ya que el número de copias insertas en el TR1 fue de dos y de diez copias en el TR4. Cuando se evaluó el comportamiento a nivel de planta individual (Capítulo 3) los eventos transgénicos no mostraron consistencias en las respuestas de cada atributo analizado en cada tipo de estrés hídrico. Esta variación en las respuestas observadas en los eventos podría deberse a los efectos de posición de las inserciones  $P_{SARK}::IPT$ , dado que la ubicación genómica indeterminada puede estar causando variaciones en la expresión génica (Xu, 2010). Este punto en particular, y luego de observar la variabilidad en las respuestas en condiciones controladas, llevó a evaluar la variabilidad que existía entre las plantas que contenían un mismo evento transgénico (Capítulo 4). Lo que se observó es una variabilidad importante en la respuesta entre las plantas de un mismo evento transgénico, lo cual puede ser a raíz de que se esté generando una regulación diferencial de las copias del transgén que tiene insertas en el genoma. Cabe mencionar en este punto que algunos trabajos reportan casos donde diferentes individuos provenientes de un mismo evento transgénico muestran entre sí variaciones no esperadas o no asociadas a la expresión del transgén incorporado (Koller et al., 2018). Este fenómeno ha sido relacionado con la posible ocurrencia de variaciones somaclonales ocurridas durante el proceso de regeneración in vitro de las plantas transgénicas. Si bien en el contexto de esta tesis no se ha investigado la ocurrencia de variaciones somaclonales sobre el genoma de las plantas estudiadas, podría ser un punto para considerar en futuras evaluaciones.

A partir de estas evidencias y a la luz de la variabilidad observada, para llevar adelante los ensayos a campo descritos en el Capítulo 4 se realizó previamente un *screening* para la selección de dos plantas dentro la población correspondiente a cada evento transgénico que tuvieron la mejor performance para el rendimiento en grano en condiciones de campo. Esto permitió obtener a partir de esta selección una mejor respuesta a campo, mostrando los trigos transgénicos una diferencia significativa respecto a su genotipo control, tal como se demostró en los resultados del Capítulo 4 y como se detalla en la Figura 6.1. Esto pudo estar dado por la presión de selección que se generó a pesar de que solo fue una generación. Valga mencionar que la variabilidad en la magnitud de las respuestas entre plantas de un mismo evento se siguió observando, pero con resultados positivos a favor del trigo transgénico.

Los trigos que contenían el transgén P<sub>SARK</sub>::IPT no manifestaron un retraso en la senescencia a pesar de que el análisis molecular detectó que estaban expresando el transgén. Estas evidencias se contraponen con otros trabajos publicados sobre plantas transgénicas que contenían el transgén P<sub>SARK</sub>::IPT, las que demostraron una alta correlación entre la expresión del transgén, altos niveles de citoquininas y retrasos en la senescencia foliar con mejoras en la actividad fotosintética (Rivero et al., 2007; 2009; Peleg et al., 2011; Reguera et al., 2013; Oneto et al., 2016).

A pesar de que no se observaron respuestas diferenciales en el rendimiento entre los materiales, con excepción de los experimentos a campo, en general el transgén indujo a establecer un mayor número de espigas por plantas (Capítulo 3, Figura 6.1) y por unidad de área (Capítulo 4, Figura 6.1) comparado al genotipo control debido posiblemente al mayor nivel de citoquininas que promovió un mayor macollaje o redujo la tasa de mortandad de

los macollos iniciados (Langer et al., 1973; Sharif y Dale et al., 1980; Suge y Iwamura, 1993). Evidencias en arroz demostraron que el número de espigas aumentó por el incremento de los niveles de citoquininas (Lin et al., 2002). Sin embargo, estas espigas en los trigos transgénicos demostraron un menor establecimiento de granos por espiga por lo que existió un efecto de compensación entre ambos atributos (Figura 6.1), razón por la cual no se evidenció una respuesta diferencial en el número de granos por unidad de área. El número de granos y el peso de los granos, tal como se detalló anteriormente, también tuvieron un efecto de compensación en plantas de trigos transgénicos: en anegamiento el peso de granos se incrementó y el número disminuyó, en cambio en déficit hídrico disminuyó el peso de los granos, pero se incrementó el número.

Gran proporción de los estudios de plantas transgénicas donde se han observados ventajas agronómicas ante el genotipo control bajo condiciones ambientales controladas, indican que cuando las plantas transgénicas son llevadas al campo no logran sostener esas ventajas (Passioura, 2012). Sin embargo con los trigos transgénicos P<sub>SARK::IPT</sub> ocurrió lo contrario, se observó una ventaja aún mayor y significativa en el rendimiento en grano respecto al genotipo control en los ensayos a campo, pero es posible que dicha respuesta haya sido asociada a una reducción en la variabilidad de las plantas seleccionadas antes de ser sembradas a campo, promoviendo una selección más estricta de los materiales que mostraron un mejor comportamiento.

En cuanto a la herencia transgeneracional, si bien el transgén no manifestó ninguna diferencia con el genotipo control, los resultados mostraron que la progenie que provino de semillas donde las plantas maternas tuvieron una mejor condición hídrica presentaron una mejor performance en cualquiera de los ambientes en los que se desarrollaron (Figura 6.1).

Contrariamente, plantas provenientes de semillas de progenie que fueron sometidas a estrés hídrico penalizaron el rendimiento en la mayoría de los ambientes (Figura 6.1). Estos resultados demuestran que se observó adaptabilidad inducida por el ambiente, aunque no en el sentido que la literatura frecuentemente reporta.

#### **6.4 Implicancias para investigaciones futuras**

A partir de esta tesis se observó que el transgén  $P_{SARK}::IPT$  es posible candidato para generar tolerancia al estrés hídrico en el genoma de trigo sin mostrar desventajas al genotipo control. Sería de interés continuar nuevas líneas de estudio con la introgresión del transgén en genotipos de elite (i.e. genética más actual con mayor potencial de rendimiento que el cultivar Pro INTA Federal). Sin embargo, para que estas respuestas sean consistentes en el tiempo y entre ambientes es deseable reducir la incertidumbre de las respuestas obtenidas ya que los resultados logrados en esta tesis demuestran una falta de consistencia en las respuestas del transgén a ambientes restrictivos.

Las desventajas dadas por la inestabilidad que tienen los eventos transgénicos deberían ser mejoradas en investigaciones futuras por lo que sería deseable: (i) obtener eventos con una copia única, los cuales está ampliamente documentado que son genotipos más estables (Ismagul et al., 2018), (ii) tener la certeza que esa copia única esté en homocigosis y (iii) establecer con certeza el sitio donde está inserto el transgén a los efectos de evitar (o caracterizar) posibles silenciamientos, y (iv) realizar retocruzamiento entre el genotipo control y los eventos transgénicos para limpiar la variabilidad somaclonal.

Por otro lado, repuestas que completarían a las observadas en el Capítulo 3 a nivel fisiológico sería estudiar (i) el nivel de citoquininas que está generando el transgén, (ii) la

actividad fotosintética, y (iii) nivel de conductancia estomática que tienen los trigos transgénicos para evaluar la eficiencia de uso del agua.

## BIBLIOGRAFIA

- Abbate, P. E., Andrade, F. H., & Culot, J. P. (1995). The effects of radiation and nitrogen on number of grains in wheat. *The Journal of Agricultural Science*, 124(3), 351-360.
- Abebe, T., Guenzi, A. C., Martin, B., & Cushman, J. C. (2003). Tolerance of mannitol-accumulating transgenic wheat to water stress and salinity. *Plant physiology*, 131(4), 1748-1755.
- Abid, M., Hakeem, A., Shao, Y., Liu, Y., Zahoor, R., Fan, Y., ... & Snider, J. L. (2018). Seed osmopriming invokes stress memory against post-germinative drought stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Environmental and Experimental Botany*, 145, 12-20.
- Abdoli, M., & Saeidi, M. (2015). The role of spike photosynthesis and foliar application of iaa on grain yield and its components of two wheat cultivars in late season drought stress.
- Acreche, M. M., Briceño-Félix, G., Sánchez, J. A. M., & Slafer, G. A. (2009). Radiation interception and use efficiency as affected by breeding in Mediterranean wheat. *Field Crops Research*, 110(2), 91-97.
- Akimoto, K., Katakami, H., Kim, H. J., Ogawa, E., Sano, C. M., Wada, Y., & Sano, H. (2007). Epigenetic inheritance in rice plants. *Annals of botany*, 100(2), 205-217.
- Akiyoshi, D. E., Klee, H., Amasino, R. M., Nester, E. W., & Gordon, M. P. (1984). T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(19), 5994-5998.
- Alexander, H. M., & Wulff, R. D. (1985). Experimental ecological genetics in *Plantago*: X. The effects of maternal temperature on seed and seedling characters in *P. lanceolata*. *The Journal of Ecology*, 271-282.
- Alexandratos, N., & Bruinsma, J. (2012). World agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision (No. 12-03, p. 4). Rome, FAO: ESA Working paper.
- Allen, R. G., Pereira, L. S., Raes, D., & Smith, M. (2006). Evapotranspiración del cultivo: guías para la determinación de los requerimientos de agua de los cultivos. Roma: FAO, 298, 0.
- Altpeiter F., Vasil V., Srivastava V., Stoeger E. and Vasil I.K. 1996. Accelerated production of transgenic wheat plants. *Plant Cell Rep.* 16: 12–17.
- Alzueta, I., Abeledo, L. G., Mignone, C. M., & Miralles, D. J. (2012). Differences between wheat and barley in leaf and tillering coordination under contrasting nitrogen and sulfur conditions. *European Journal of Agronomy*, 41, 92-102.



- Andrade, F. H. (1995). Analysis of growth and yield of maize, sunflower and soybean grown at Balcarce, Argentina. *Field Crops Research*, 41(1), 1-12.
- Andrade, F. H. C., Uhart, A. G., Otegui, S. A., Andrade, M. E. F., Cirilo, A., Uhart, S., & Otegui, M. (1996). *Ecofisiología del cultivo de maíz* (No. 633.15 584.92041). DekalbPress.
- Araki, H., Hamada, A., Hossain, M. A., & Takahashi, T. (2012). Waterlogging at jointing and/or after anthesis in wheat induces early leaf senescence and impairs grain filling. *Field Crops Research*, 137, 27-36.
- Argyros, R. D., Mathews, D. E., Chiang, Y. H., Palmer, C. M., Thibault, D. M., Etheridge, N., ... & Schaller, G. E. (2008). Type B response regulators of Arabidopsis play key roles in cytokinin signaling and plant development. *The Plant Cell*, 20(8), 2102-2116.
- Argueso, C. T., Raines, T., & Kieber, J. J. (2010). Cytokinin signaling and transcriptional networks. *Current opinion in plant biology*, 13(5), 533-539.
- Austin, R. B., Bingham, J., Blackwell, R. D., Evans, L. T., Ford, M. A., Morgan, C. L., & Taylor, M. (1980). Genetic improvements in winter wheat yields since 1900 and associated physiological changes. *The Journal of Agricultural Science*, 94(3), 675-689.
- Bachmann A, Fernandez-Lopez J, Ginsburg S, Thomas H, Bouwkamp JC, Solomos T, Matile P. (1994). Stay-green genotypes of Phaseolus vulgaris L. chloroplast proteins and chlorophyll catabolites during foliar senescence. *New Phytologist* 126,593–600.
- Backhaus, S., Kreyling, J., Grant, K., Beierkuhnlein, C., Walter, J., & Jentsch, A. (2014). Recurrent mild drought events increase resistance toward extreme drought stress. *Ecosystems*, 17(6), 1068-1081.
- Banik, A., Mukhopadhyaya, S. K., & Dangar, T. K. (2016). Characterization of N<sub>2</sub>-fixing plant growth promoting endophytic and epiphytic bacterial community of Indian cultivated and wild rice (*Oryza* spp.) genotypes. *Planta*, 243(3), 799-812.
- Baracaldo, A., Carvajal, R., Romero, A. P., Prieto, A. M., García, F. J., Fischer, G., & Miranda, D. (2014). El anegamiento afecta el crecimiento y producción de biomasa en tomate chonto (*Solanum lycopersicum* L.), cultivado bajo sombrero. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 8(1), 92-102.
- Barnabás, B., Jäger, K., & Fehér, A. (2008). The effect of drought and heat stress on reproductive processes in cereals. *Plant, cell & environment*, 31(1), 11-38.
- Barry, T. N., & Manley, T. R. (1984). The role of condensed tannins in the nutritional value of *Lotus pedunculatus* for sheep: 2. Quantitative digestion of carbohydrates and proteins. *British Journal of Nutrition*, 51(3), 493-504.

- Battisti, D. S., & Naylor, R. L. (2009). Historical warnings of future food insecurity with unprecedented seasonal heat. *Science*, 323(5911), 240-244.
- Baulcombe, D. (2004). RNA silencing in plants. *Nature*, 431(7006), 356.
- Begcy, K., & Walia, H. (2015). Drought stress delays endosperm development and misregulates genes associated with cytoskeleton organization and grain quality proteins in developing wheat seeds. *Plant Science*, 240, 109-119.
- Belford, R. K. (1981). Response of winter wheat to prolonged waterlogging under outdoor conditions. *The Journal of Agricultural Science*, 97(3), 557-568.
- Bez nec A, Faccio P, Baroli I, Décima Oneto C, Blumwald E, Llorente B, Bossio E, Abeledo LG, Díaz Paleo A, Miralles DJ (2014). Mejoras en el comportamiento agronómico de trigo (*Triticum aestivum* L.) transgénico sometido a déficit hídrico: causas y consecuencias. XV Congreso Latinoamericano de Fisiología Vegetal - XXX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal, Mar del Plata, Argentina
- Bez nec A., Faccio P., Blumwald E., Díaz Paleo A. (2011). Obtención de plantas transgénicas de trigo (*Triticum aestivum* L.) expresando isopenteniltransferasa, enzima responsable del retardo en la senescencia. VIII Encuentro de Biotecnología Agropecuaria Argentina. Buenos Aires, Argentina
- Bez nec A., Faccio P., Décima Oneto C., Baroli I., Soto G., Bossio E., Blumwald E., Llorente B., Díaz Paleo A. (2013). Caracterización fisiológica y molecular de líneas de trigo que expresan el transgen *ark::ipt* bajo estrés hídrico. XLVII Congreso Argentino de Genética, Salta, Argentina.
- Bhalla P. L. (2006) Genetic engineering of wheat - current challenges and opportunities. *Trends Biotechnol.* 24: 305-311.
- Bianco, P., Cao, X., Frenette, P. S., Mao, J. J., Robey, P. G., Simmons, P. J., & Wang, C. Y. (2013). The meaning, the sense and the significance: translating the science of mesenchymal stem cells into medicine. *Nature medicine*, 19(1), 35-42.
- Boyko, A., & Kovalchuk, I. (2008). Epigenetic control of plant stress response. *Environmental and molecular mutagenesis*, 49(1), 61-72.
- Boyko, A., Blevins, T., Yao, Y., Golubov, A., Bilichak, A., Ilnytsky, Y.,...& Kovalchuk, I. (2010). Transgenerational adaptation of *Arabidopsis* to stress requires DNA methylation and the function of Dicer-like proteins. *PloS one*, 5(3), e9514.
- Bogard, M., Jourdan, M., Allard, V., Martre, P., Perretant, MR, Ravel, C., Heumez, E. Orford, S., Snape, J., Griffiths, S., Gaju, O., Foulkes, J., Le Gouis. J. (2011). Date anthesis mainly explained correlations between senescence after anthesis sheet, grain yield and grain protein concentration in a

- population of winter wheat segregating QTL time to flowering J. Exp. Bot., 62 (2011), pp. 3621-3636.
- Borrás, L., Slafer, G. A., & Otegui, M. E. (2004). Seed dry weight response to source-sink manipulations in wheat, maize and soybean: a quantitative reappraisal. *Field Crops Research*, 86(2), 131-146.
- Borrill, P., Fahy, B., Smith, A. M., & Uauy, C. (2015). Wheat grain filling is limited by grain filling capacity rather than the duration of flag leaf photosynthesis: a case study using NAM RNAi plants. *PloS one*, 10(8), e0134947.
- Brock, R. D., & Davidson, J. L. (1994). 5-Azacytidine and gamma rays partially substitute for cold treatment in vernalizing winter wheat. *Environmental and Experimental Botany*, 34(2), 195-199.
- Buchanan-Wollaston, V. (1997). The molecular biology of leaf senescence. *Journal of experimental botany*, 48(2), 181-199.
- Cannell, R., Belford, R. K., Gales, K., Thomson, R. J., & Webster, C. P. (1984). Effects of waterlogging and drought on winter wheat and winter barley grown on a clay and a sandy loam soil. *Plant and soil*, 80(1), 53-66.
- Calderini, D. F., & Reynolds, M. P. (2000). Changes in grain weight as a consequence of de-graining treatments at pre-and post-anthesis in synthetic hexaploid lines of wheat (*Triticum durum* x *T. tauschii*). *Functional Plant Biology*, 27(3), 183-191.
- Calderini, D. F., & Slafer, G. A. (1998). Changes in yield and yield stability in wheat during the 20th century. *Field Crops Research*, 57(3), 335-347.
- Calderini, D. F., & Slafer, G. A. (1999). Has yield stability changed with genetic improvement of wheat yield? *Euphytica*, 107(1), 51-59.
- Calderini, D. F., Reynolds, M. P., & Slafer, G. A. (1999). Genetic gains in wheat yield and associated physiological changes during the twentieth century. *Wheat: Ecology and physiology of yield determination*, 351-377.
- Caputo, C., & Barneix, A. J. (1997). Export of amino acids to the phloem in relation to N supply in wheat. *Physiologia Plantarum*, 101(4), 853-860.
- Carretero, R. (2011). Una aproximación mecanística al problema de las enfermedades foliares en el cultivo de trigo (Doctoral dissertation, Tesis Doctoral. Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina).
- Case, A. L., Lacey, E. P., & Hopkins, R. G. (1996). Parental effects in *Plantagolanceolata* L. II. Manipulation of grandparental temperature and parental flowering time. *Heredity*, 76(3), 287-295.

- Castiglioni, P., Warner, D., Bensen, R. J., Anstrom, D. C., Harrison, J., Stoecker, M., ... & Navarro, S. (2008). Bacterial RNA chaperones confer abiotic stress tolerance in plants and improved grain yield in maize under water-limited conditions. *Plant physiology*, 147(2), 446-455.
- Chen, K., & Arora, R. (2013). Priming memory invokes seed stress-tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, 94, 33-45.
- Chinnusamy, V., & Zhu, J. K. (2009). Epigenetic regulation of stress responses in plants. *Current opinion in plant biology*, 12(2), 133-139.
- Christopher J., Manschadi A., Hammer G., Borrell A. (2008). Development and physiological features associated with high performance and stay green phenotype in wheat. *Aust. J. Agric. Res.*, 59. 354-364
- Connor, D. J., Timsina, J., & Humphreys, E. (2003). Prospects for permanent beds for the rice–wheat system. *Improving the Productivity and Sustainability of Rice–Wheat Systems: Issues and Impacts*, (improvingthepro), 197-210.
- Cowan, A. K., Freeman, M., Björkman, P. O., Nicander, B., Sitbon, F., & Tillberg, E. (2005). Effects of senescence-induced alteration in cytokinin metabolism on source-sink relationships and ontogenic and stress-induced transitions in tobacco. *Planta*, 221(6), 801-814.
- Cox, G. M., & Cochran, W. G. (1946). Designs of greenhouse experiments for statistical analysis. *Soil Science*, 62(1), 87-98.
- Dalling M (1985) The physiological basis of nitrogen redistribution during grain filling in cereals. In: HarperJE, SchraderLE, HowellRW (eds) *Exploitation of Physiological and Genetic Variability to Enhance Crop Productivity*. Waverly Press, Baltimore, MD, pp. 55–71
- Daryanto, S., Wang, L., & Jacinthe, P. A. (2017). Global synthesis of drought effects on cereal, legume, tuber and root crops production: A review. *Agricultural Water Management*, 179, 18-33.
- Davies, W. J., & Zhang, J. (1991). Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. *Annual review of plant biology*, 42(1), 55-76.
- Demeulemeester, M. A. C., Van Stallen, N., & De Proft, M. P. (1999). Degree of DNA methylation in chicory (*Cichoriumintybus* L.): influence of plant age and vernalization. *Plant science*, 142(1), 101-108.
- de San Celedonio, R. P., Micheloud, J. R., Abeledo, L. G., Miralles, D. J., & Slafer, G. A. (2014 a). Riesgo de anegamiento en trigo (*Triticum aestivum* L) para distintas localidades de la región triguera Argentina. *Ciencia del suelo*, 32(2), 233-246.
- de San Celedonio, R. P., Abeledo, L. G., & Miralles, D. J. (2014b). Identifying the critical period for waterlogging on yield and its components in wheat and barley. *Plant and Soil*, 378(1-2), 265-277.

- Derkx, A.P., Orford, S., Griffiths, S., Foulkes, M.J. (2012). Hawkesford. Identification of differentially senescing mutant wheat and the impact on yield, biomass and nitrogen partition. *J. Integr. Plant Biol.*, 54 (2012), pp. 555-566
- De Vita, P., Nicosia, O. L. D., Nigro, F., Platani, C., Riefolo, C., Di Fonzo, N., & Cattivelli, L. (2007). Breeding progress in morpho-physiological, agronomical and qualitative traits of durum wheat cultivars released in Italy during the 20th century. *European Journal of Agronomy*, 26(1), 39-53.
- Donald (1962). Looking for performance *J. Aust. Inst. Agr Sci.*, 28 (1), pp. 171-178.
- Donald, CM and J. Hamblin. (1976). Performance index and harvest organic cereals as breeding and agronomic criteria *Adv vegetables. Agron.*, 28 (1) (1976), pp. 361-41
- Dowen, R. H., Pelizzola, M., Schmitz, R. J., Lister, R., Dowen, J. M., Nery, J. R., ... & Ecker, J. R. (2012). Widespread dynamic DNA methylation in response to biotic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(32), E2183-E2191.
- Dubcovsky, J., & Dvorak, J. (2007). Genome plasticity a key factor in the success of polyploid wheat under domestication. *Science*, 316(5833), 1862-1866.
- Dreccer, M. F., van Herwaarden, A. F., & Chapman, S. C. (2009). Grain number and grain weight in wheat lines contrasting for stem water soluble carbohydrate concentration. *Field Crops Research*, 112(1), 43-54.
- Dreccer, M. F., Van Oijen, M., Schapendonk, A. H. C. M., Pot, C. S., & Rabbinge, R. (2000). Dynamics of vertical leaf nitrogen distribution in a vegetative wheat canopy. Impact on canopy photosynthesis. *Annals of Botany*, 86(4), 821-831.
- Echenique, V., Stamova, B., Wolters, P., Lazo, G., Carollo, V., & Dubcovsky, J. (2002). Frequencies of Ty1-copia and Ty3-gypsy retroelements within the Triticeae EST databases. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 104(5), 840-844.
- Edmeades, G. O., McMaster, G. S., White, J. W., & Campos, H. (2004). Genomics and the physiologist: bridging the gap between genes and crop response. *Field Crops Research*, 90(1), 5-18.
- Elhani, S., Martos, V., Rharrabti, Y., Royo, C., & del Moral, L. G. (2007). Contribution of main stem and tillers to durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. durum) grain yield and its components grown in Mediterranean environments. *Field Crops Research*, 103(1), 25-35.
- Evans, J. R. (1983). Nitrogen and photosynthesis in the flag leaf of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant physiology*, 72(2), 297-302.
- Evans, J. R. (1989). Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C 3 plants. *Oecologia*, 78 (1), 9-19.

- Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D., & Basra, S. M. (2009). A. 2009. Plant drought stress: Effects, mechanisms and management. *Agronomy for sustainable development*, 29(1), 185-212.
- Federoff N.V. (1989) Maize transposable elements. in *Mobile DNA*, eds Berg D.E., Howe M.M.(American Society for Microbiology, Washington, DC.) pp 375–41
- Feng, Y., Zhang, X., Wu, T., Xu, X., Han, Z., & Wang, Y. (2017). Methylation effect on IPT5b gene expression determines cytokinin biosynthesis in apple rootstock. *Biochemical and biophysical research communications*, 482(4), 604-609.
- Feller, U., & Fischer, A. (1994). Nitrogen metabolism in senescing leaves. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 13(3), 241-273.
- Feller, U., & Keist, M. (1986). Senescence and nitrogen metabolism in annual plants. *Fundamental, ecological and agricultural aspects of nitrogen metabolism in higher plants*. Dordrecht: MartinusNijhoff Publishers, 219-34.
- Fernández Long, M. E., Spescha, L., Barnatán, I., & Murphy, G. M. (2012). Modelo de balance hidrológico operativo para el agro (BHOA). *Rev. Agronom. Ambiente*, 32(1-2), 31-47.
- Finnegan EJ, Genger RK, Kovac K, Peacock WJ, Dennis ES (1998). DNA methylation and the promotion of flowering by vernalization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 5824-5829.
- Finnegan, E. J., Genger, R. K., Peacock, W. J., & Dennis, E. S. (1998). DNA methylation in plants. *Annual review of plant biology*, 49(1), 223-247.
- Fischer, R. A. (1985). Number of kernels in wheat crops and the influence of solar radiation and temperature. *The Journal of Agricultural Science*, 105(2), 447-461.
- Fischer, R. A. (2011). Wheat physiology: a review of recent developments. *Crop and Pasture Science*, 62(2), 95-114.
- Fischer, R. A., & Edmeades, G. O. (2010). Breeding and cereal yield progress. *Crop Science*, 50(Supplement\_1), S-85.
- Foulkes, M. J., Hawkesford, M. J., Barraclough, P. B., Holdsworth, M. J., Kerr, S., Kightley, S., & Shewry, P. R. (2009). Identifying traits to improve the nitrogen economy of wheat: recent advances and future prospects. *Field Crops Research*, 114(3), 329-342.
- Foulkes, M. J., Sylvester-Bradley, R., Weightman, R., & Snape, J. W. (2007). Identifying physiological traits associated with improved drought resistance in winter wheat. *Field Crops Research*, 103(1), 11-24.

- Gaju, O., Allard, V., Martre, P., Snape, J. W., Heumez, E., LeGouis, J., ... & Hubbart, S. (2011). Identification of traits to improve the nitrogen-use efficiency of wheat genotypes. *Field Crops Research*, 123(2), 139-152.
- Gaju, O., Allard, V., Martre, P., Le Gouis, J., Moreau, D., Bogard, M., ... & Foulkes, M. J. (2014). Nitrogen partitioning and remobilization in relation to leaf senescence, grain yield and grain nitrogen concentration in wheat cultivars. *Field Crops Research*, 155, 213-223.
- Gan, S., & Amasino, R. M. (1997). Making sense of senescence (molecular genetic regulation and manipulation of leaf senescence). *Plant physiology*, 113(2), 313-319.
- García, G. (2012). "Rendimiento potencial en trigo: identificación de atributos ecofisiológicos favorables en líneas doble haploide" Tesis para obtener el grado de Magister de la Universidad de Buenos Aires área Producción Vegetal otorgado por FAUBA. Escuela para Graduados
- Gelang, J., Pleijel, H., Sild, E., Danielsson, H., Younis, S., & Sellden, G. (2000). Rate and duration of grain filling in relation to flag leaf senescence and grain yield in spring wheat (*Triticum aestivum*) exposed to different concentrations of ozone. *Physiologia Plantarum*, 110(3), 366-375.
- Giunta, F., Motzo, R., & Deidda, M. (1993). Effect of drought on yield and yield components of durum wheat and triticale in a Mediterranean environment. *Field Crops Research*, 33(4), 399-409.
- Goicoechea, N., Antolin, M. C., & Sánchez-Díaz, M. (1997). Gas exchange is related to the hormone balance in mycorrhizal or nitrogen-fixing alfalfa subjected to drought. *Physiologia Plantarum*, 100(4), 989-997.
- Grashoff, C., & d'Antuono, L. F. (1997). Effect of shading and nitrogen application on yield, grain size distribution and concentrations of nitrogen and water soluble carbohydrates in malting spring barley (*Hordeum vulgare* L.). *European Journal of Agronomy*, 6(3), 275-293.
- Grassini, P., Eskridge, K. M., & Cassman, K. G. (2013). Distinguishing between yield advances and yield plateaus in historical crop production trends. *Nature communications*, 4, 2918.
- González, F. G., Miralles, D. J., & Slafer, G. A. (2011). Wheat floret survival as related to pre-anthesis spike growth. *Journal of Experimental Botany*, 62(14), 4889-4901.
- González-Navarro, O. E., Griffiths, S., Molero, G., Reynolds, M. P., & Slafer, G. A. (2015). Dynamics of floret development determining differences in spike fertility in an elite population of wheat. *Field Crops Research*, 172, 21-31.
- González, F. G., Capella, M., Ribichich, K. F., Curín, F., Giacomelli, J. I., Ayala, F., ... & Chan, R. L. (2019). Field-grown transgenic wheat expressing the sunflower gene HaHB4 significantly outyields the wild type. *Journal of experimental botany*, 70(5), 1669-1681.

- Grashoff, C., & d'Antuono, L. F. (1997). Effect of shading and nitrogen application on yield, grain size distribution and concentrations of nitrogen and water soluble carbohydrates in malting spring barley (*Hordeum vulgare* L.). *European Journal of Agronomy*, 6(3-4), 275-293.
- Guo, Y., Cai, Z., & Gan, S. (2004). Transcriptome of *Arabidopsis* leaf senescence. *Plant, cell & environment*, 27(5), 521-549.
- Gupta, N. K., Gupta, S., & Kumar, A. (2001). Effect of water stress on physiological attributes and their relationship with growth and yield of wheat cultivars at different stages. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 186(1), 55-62.
- Ha, S., Vankova, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., & Tran, L. S. P. (2012). Cytokinins: metabolism and function in plant adaptation to environmental stresses. *Trends in plant science*, 17(3), 172-179.
- Hajouj, T., Michelis, R., & Gepstein, S. (2000). Cloning and characterization of a receptor-like protein kinase gene associated with senescence. *Plant Physiology*, 124(3), 1305-1314.
- Hasan, A. K., Herrera, J., Lizana, C., & Calderini, D. F. (2011). Carpel weight, grain length and stabilized grain water content are physiological drivers of grain weight determination of wheat. *Field Crops Research*, 123(3), 241-247.
- Hauser, M. T., Aufsatz, W., Jonak, C., & Luschig, C. (2011). Transgenerational epigenetic inheritance in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1809(8), 459-468.
- Hawkesford, M. J., Araus, J. L., Park, R., Calderini, D., Miralles, D., Shen, T., ... & Parry, M. A. (2013). Prospects of doubling global wheat yields. *Food and Energy Security*, 2(1), 34-48.
- Hay, R. K. M. (1995). Harvest index: a review of its use in plant breeding and crop physiology. *Annals of applied biology*, 126(1), 197-216.
- Herman, J. J., Sultan, S. E., Horgan-Kobelski, T., & Riggs, C. (2012). Adaptive transgenerational plasticity in an annual plant: grandparental and parental drought stress enhance performance of seedlings in dry soil.
- Hirayama, H., Tsukada, Y., Maeda, T., & Kamata, N. (2010). Marked enhancement in the efficiency of deep-ultraviolet AlGaIn light-emitting diodes by using a multiquantum-barrier electron blocking layer. *Applied Physics Express*, 3(3), 031002.
- Hirochika H. (1995). Activation of plant retrotransposons by stress. Modification of gene expression and non-mendelian inheritance. 1995, Japan: NIAR, 15-21.
- Hikosaka, K. (2004). Interspecific difference in the photosynthesis–nitrogen relationship: patterns, physiological causes, and ecological importance. *Journal of plant research*, 117(6), 481-494.



- Hipps, L. E., Asrar, G., & Kanemasu, E. T. (1983). Assessing the interception of photosynthetically active radiation in winter wheat. *Agricultural Meteorology*, 28(3), 253-259.
- Hobbs, S. L., Warkentin, T. D., & DeLong, C. M. (1993). Transgene copy number can be positively or negatively associated with transgene expression. *Plant molecular biology*, 21(1), 17-26.
- Hoffmann, B. (2008). Alteration of drought tolerance of winter wheat caused by translocation of rye chromosome segment 1RS. *Cereal Research Communications*, 36(2), 269-278.
- Hossain, M. A., & Uddin, S. N. (2011). Mechanisms of waterlogging tolerance in wheat: morphological and metabolic adaptations under hypoxia or anoxia. *Australian journal of crop science*, 5(9), 1094.
- Horwitz, W., Chichilo, P., & Reynolds, H. (1975). Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists.
- Howell, S. H., Lall, S., & Che, P. (2003). Cytokinins and shoot development. *Trends in plant science*, 8(9), 453-459.
- Hsiao, T. C. (1973). Plant responses to water stress. *Annual review of plant physiology*, 24(1), 519-570.
- <http://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/es/>
- Huang, Y., Chen, L., Fu, B., Huang, Z., & Gong, J. (2005). The wheat yields and water-use efficiency in the Loess Plateau: straw mulch and irrigation effects. *Agricultural water management*, 72(3), 209-222.
- Huynh, L. N., VanToai, T., Streeter, J., & Banowetz, G. (2005). Regulation of flooding tolerance of SAG12: ipt Arabidopsis plants by cytokinin. *Journal of experimental botany*, 56(415), 1397-1407.
- Ingram, J., & Bartels, D. (1996). The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual review of plant biology*, 47(1), 377-403.
- IPCC (2014) [https://www.ipcc.ch/pdf/assessment-report/ar5/wg2/ar5\\_wgII\\_spm\\_es.pdf](https://www.ipcc.ch/pdf/assessment-report/ar5/wg2/ar5_wgII_spm_es.pdf)
- Ismagul, A., Iskakova, G., Harris, J. C., & Eliby, S. (2014). Biolistic transformation of wheat with centrophenoxine as a synthetic auxin. In *Crop breeding* (pp. 191-202). Humana Press, New York, NY.
- Jatoi, W. A., Baloch, M. J., Kumbhar, M. B., Khan, N. U., & Kerio, M. I. (2011). Effect of water stress on physiological and yield parameters at anthesis stage in elite spring wheat cultivars. *Sarhad J. Agric*, 27(1), 59-65.

- Ji, X., Shiran, B., Wan, J., Lewis, D. C., Jenkins, C. L., Condon, A. G., ... & Dolferus, R. (2010). Importance of pre-anthesis anther sink strength for maintenance of grain number during reproductive stage water stress in wheat. *Plant, Cell & Environment*, 33(6), 926-942.
- Jordi, W., Schapendonk, A. H. C. M., Davelaar, E., Stoopen, G. M., Pot, C. S., De Visser, R., ... & Amasino, R. M. (2000). Increased cytokinin levels in transgenic PSAG12-IPT tobacco plants have large direct and indirect effects on leaf senescence, photosynthesis and N partitioning. *Plant, Cell & Environment*, 23(3), 279-289.
- Joshi, A., Kumari, M., Singh, V., Reddy, C., Kumar, S., Rane, J., Chand, R. (2007). Stay green feature: variation, inheritance and association with resistance to stain on spring wheat (*Triticum aestivum* L.) *Euphytica*, 153, pp. 59-71
- Kim, J. M., To, T. K., Ishida, J., Morosawa, T., Kawashima, M., Matsui, A., ... & Seki, M. (2008). Alterations of lysine modifications on the histone H3 N-tail under drought stress conditions in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 49(10), 1580-1588.
- Kirby, E. J. M. (1988). Analysis of leaf, stem and ear growth in wheat from terminal spikelet stage to anthesis. *Field crops research*, 18(2-3), 127-140.
- Kohli, A., Twyman, R. M., Abranches, R., Wegel, E., Stoger, E., & Christou, P. (2003). Transgene integration, organization and interaction in plants. *Plant molecular biology*, 52(2), 247-258.
- Kogan, F. N. (1997). Global drought watch from space. *Bulletin of the American Meteorological Society*, 78(4), 621-636.
- Kou, H. P., Li, Y., Song, X. X., Ou, X. F., Xing, S. C., Ma, J., ... & Liu, B. (2011). Heritable alteration in DNA methylation induced by nitrogen-deficiency stress accompanies enhanced tolerance by progenies to the stress in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of plant physiology*, 168(14), 1685-1693.
- Kovalchuk, N., Smith, J., Pallotta, M., Singh, R., Ismagul, A., Eliby, S., ... & Lopato, S. (2009). Characterization of the wheat endosperm transfer cell-specific protein TaPR60. *Plant molecular biology*, 71(1-2), 81-98.
- Kreps, J. A., Wu, Y., Chang, H. S., Zhu, T., Wang, X., & Harper, J. F. (2002). Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic, and cold stress. *Plant physiology*, 130(4), 2129-2141.
- Kumar, S., & Fladung, M. (2001). Gene stability in transgenic aspen (*Populus*). II. Molecular characterization of variable expression of transgene in wild and hybrid aspen. *Planta*, 213(5), 731-740.
- Kuppu, S., Mishra, N., Hu, R., Sun, L., Zhu, X., Shen, G., ... & Zhang, H. (2013). Water-deficit inducible expression of a cytokinin biosynthetic gene IPT improves drought tolerance in cotton. *PLoS One*, 8(5), e64190.

- Kühbauch, W., & Thome, U. (1989). Nonstructural carbohydrates of wheat stems as influenced by sink-source manipulations. *Journal of Plant Physiology*, 134(2), 243-250.
- Langer, S. Z. (1973). The regulation of transmitter release elicited by nerve stimulation through a presynaptic feed-back mechanism. In *Frontiers in catecholamine research* (pp. 543-549). Pergamon.
- Lee, R. H., Wang, C. H., Huang, L. T., & Chen, S. C. G. (2001). Leaf senescence in rice plants: cloning and characterization of senescence up-regulated genes. *Journal of Experimental Botany*, 52(358), 1117-1121.
- Levitt, J. (1980). *Responses of Plants to Environmental Stress, Volume 1: Chilling, Freezing, and High Temperature Stresses*. Academic Press.
- Li, X., Cai, J., Liu, F., Dai, T., Cao, W., & Jiang, D. (2014). Cold priming drives the sub-cellular antioxidant systems to protect photosynthetic electron transport against subsequent low temperature stress in winter wheat. *Plant physiology and biochemistry*, 82, 34-43.
- Li, C. H., Yu, N., Jiang, S. M., Shangguan, X. X., Wang, L. J., & Chen, X. Y. (2008). Down-regulation of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase reveals a role of cytokinin in promoting transmethylation reactions. *Planta*, 228(1), 125.
- Lim, P. O., Kim, H. J., & Gil Nam, H. (2007). Leaf senescence. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 58, 115-136.
- Lin, C. C., Hsu, Y. T., & Kao, C. H. (2002). Ammonium ion, ethylene, and NaCl-induced senescence of detached rice leaves. *Plant growth regulation*, 37(1), 85-92.
- Liu, Y., El-Naggar, S., Darling, D. S., Higashi, Y., & Dean, D. C. (2008). Zeb1 links epithelial-mesenchymal transition and cellular senescence. *Development*, 135(3), 579-588.
- Lo Valvo, P.J., Miralles D.J. (2017) .El progreso genético Serrago la AR en las variedades de trigo pan argentinas estrenadas entre 1900 y 2011: Los cambios en los componentes del rendimiento fisiológico y numérico. *Campo de las cosechas Reseach*. Aceptado con una revisión importante. Mayo de 2017
- Lobell, D. B., & Ortiz-Monasterio, J. I. (2007). Impacts of day versus night temperatures on spring wheat yields. *Agronomy journal*, 99(2), 469-477.
- Madden, L. V., and F. W. Nutter Jr. "Modeling crop losses at the field scale." *Canadian Journal of Plant Pathology* 17.2 (1995): 124-137.
- Madlung, A., & Comai, L. (2004). The effect of stress on genome regulation and structure. *Annals of botany*, 94(4), 481-495.
- Magrin, G. O., Travasso, M. I., & Rodríguez, G. R. (2005). Changes in climate and crop production during the 20th century in Argentina. *Climatic change*, 72(1), 229-249.

- Magrin, G., C. Gay García, D. Cruz Choque, J.C. Giménez, A.R. Moreno, G.J. Nagy, C. Nobre and A. Villamizar, (2007) Latin America. Climate Change 2007: Impacts, Adaptation and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, M.L. Parry, O.F. Canziani, J.P. Palutikof, P.J. van der Linden and C.E. Hanson, Eds., Cambridge University Press, Cambridge, UK, 581-615.
- Mahalakshmi, V., & Bidinger, F. R. (1985). Water stress and time of floral initiation in pearl millet. *The Journal of Agricultural Science*, 105(2), 437-445.
- Majid, S. A., Asghar, R., & Murtaza, G. (2007). Yield stability analysis conferring adaptation of wheat to pre-and post-anthesis drought conditions. *Pak. J. Bot*, 39(5), 1623-1637.
- Maloney, V. J., Park, J. Y., Unda, F., & Mansfield, S. D. (2015). Sucrose phosphate synthase and sucrose phosphate phosphatase interact in planta and promote plant growth and biomass accumulation. *Journal of experimental botany*, 66(14), 4383-4394.
- Marti, J., Savin, R., & Slafer, G. A. (2015). Wheat yield as affected by length of exposure to waterlogging during stem elongation. *Journal of agronomy and crop science*, 201(6), 473-486.
- Martre, P., Porter, J. R., Jamieson, P. D., & Triboï, E. (2003). Modeling grain nitrogen accumulation and protein composition to understand the sink/source regulations of nitrogen remobilization for wheat. *Plant physiology*, 133(4), 1959-1967.
- Maydup, M. L., Antonietta, M., Guamet, J. J., Graciano, C., López, J. R., & Tambussi, E. A. (2010). The contribution of ear photosynthesis to grain filling in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Field Crops Research*, 119(1), 48-58.
- McCabe, M. S., Garratt, L. C., Schepers, F., Jordi, W. J., Stoop, G. M., Davelaar, E.,... & Davey, M. R. (2001). Effects of PSAG12-IPT gene expression on development and senescence in transgenic lettuce. *Plant Physiology*, 127(2), 505-516.
- McClintock, B. (1984). The significance of responses of the genome to challenge. Volume 226, Issue 4676, 1984, Pages 792-801
- Meijón, M., Jesús Cañal, M., Valledor, L., Rodríguez, R., & Feito, I. (2011). Epigenetic and physiological effects of gibberellin inhibitors and chemical pruners on the floral transition of azalea. *Physiologia plantarum*, 141(3), 276-288.
- Miao, S. L., Bazzaz, F. A., & Primack, R. B. (1991). Persistence of maternal nutrient effects in *Plantago major*: the third generation. *Ecology*, 72(5), 1634-1642.
- Miralles, D. J., & Slafer, G. A. (1999). Wheat development. Wheat: ecology and physiology of yield determination, 13-43.

- Miralles, D. J., & Slafer, G. A. (2007). Sink limitations to yield in wheat: how could it be reduced? *Journal of Agricultural Science*, 2007, vol. 145, núm. 2, p. 139-149.
- Miralles, D. J., & Slafer, G. A. (2007). Sink limitations to yield in wheat: how could it be reduced? *Journal of Agricultural Science*, 2007, vol. 145, núm. 2, p. 139-149.
- Miralles, D. J., Katz, S. D., Colloca, A., & Slafer, G. A. (1998). Floret development in near isogenic wheat lines differing in plant height. *Field Crops Research*, 59(1), 21-30.
- Mirbahar, A. A., Markhand, G. S., Mahar, A. R., Abro, S. A., & Kanhar, N. A. (2009). Effect of water stress on yield and yield components of wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties. *Pak. J. Bot*, 41(3), 1303-1310.
- Mirouze, M., & Paszkowski, J. (2011). Epigenetic contribution to stress adaptation in plants. *Current opinion in plant biology*, 14(3), 267-274.
- Mittler, R., & Blumwald, E. (2010). Genetic engineering for modern agriculture: challenges and perspectives. *Annual review of plant biology*, 61, 443-462.
- Miyashima, S., Sebastian, J., Lee, J. Y., & Helariutta, Y. (2013). Stem cell function during plant vascular development. *The EMBO journal*, 32(2), 178-193.
- Monteith M. H. and Unsworth (1990). Unsworth Principles of Environmental Physics (second edition), Edward Arnold, London (1990), p. 29
- Mok, D. W., & Mok, M. C. (2001). Cytokinin metabolism and action. *Annual review of plant biology*, 52(1), 89-118.
- Naqvi, S. S. M. (1999). Plant hormones and stress phenomena. *Handbook of Plant and Crop Stress*, 709-730.
- Nehra, N. S., Chibbar, R. N., Leung, N., Caswell, K., Mallard, C., Steinhauer, L., ... & Kartha, K. K. (1994). Self-fertile transgenic wheat plants regenerated from isolated scutellar tissues following microprojectile bombardment with two distinct gene constructs. *The Plant Journal*, 5(2), 285-297.
- Noodén, L. D., Guiamét, J. J., & John, I. (1997). Senescence mechanisms. *Physiologia plantarum*, 101(4), 746-753.
- Oneto, C. D., Otegui, M. E., Baroli, I., Bezec, A., Faccio, P., Bossio, E., ... & Lewi, D. (2016). Water deficit stress tolerance in maize conferred by expression of an isopentenyltransferase (IPT) gene driven by a stress-and maturation-induced promoter. *Journal of biotechnology*, 220, 66-77.
- Oosterhuis, D. M., & Cartwright, P. M. (1983). Spike Differentiation and Floret Survival in Semidwarf Spring Wheat as Affected by Water Stress and Photoperiod 1. *Crop Science*, 23(4), 711-717.

- Parry, M. A., Reynolds, M., Salvucci, M. E., Raines, C., Andralojc, P. J., Zhu, X. G.,... &Furbank, R. T. (2010). Raising yield potential of wheat. II. Increasing photosynthetic capacity and efficiency. *Journal of experimental botany*, 62(2), 453-467.
- Passioura, J. B. (1977). Grain yield, harvest index, and water use of wheat. *Journal of the Australian Institute of Agricultural Science*.
- Passioura, J. B. (1996). Drought and drought tolerance. In *Drought tolerance in higher plants: genetical, physiological and molecular biological analysis* (pp. 1-5). Springer Netherlands.
- Passioura, J. B. (2002). Environmental biology and crop improvement. *Functional Plant Biology*, 29(5), 537-546.
- Passioura, J. B. (2012). Phenotyping for drought tolerance in grain crops: when is it useful to breeders?. *Functional Plant Biology*, 39(11), 851-859.
- Pastor, V., Luna, E., Mauch-Mani, B., Ton, J., &Flors, V. (2013). Primed plants do not forget. *Environmental and experimental botany*, 94, 46-56.
- Paszkowski, J., &Grossniklaus, U. (2011). Selected aspects of transgenerational epigenetic inheritance and resetting in plants. *Current opinion in plant biology*, 14(2), 195-203.
- Pedró, A., Savin, R., &Slafer, G. A. (2012). Crop productivity as related to single-plant traits at key phenological stages in durum wheat. *Field Crops Research*, 138, 42-51.
- Peleg, Z., &Blumwald, E. (2011). Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. *Current opinion in plant biology*, 14(3), 290-295.
- Pellegrineschi, A., Noguera, L. M., Skovmand, B., Brito, R. M., Velazquez, L., Salgado, M. M., ... & Hoisington, D. (2002). Identification of highly transformable wheat genotypes for mass production of fertile transgenic plants. *Genome*, 45(2), 421-430.
- Perdomo, J. A., Conesa, M. À., Medrano, H., Ribas-Carbó, M., &Galmés, J. (2015). Effects of long-term individual and combined water and temperature stress on the growth of rice, wheat and maize: relationship with morphological and physiological acclimation. *Physiologia Plantarum*, 155(2), 149-165.
- Pepper, G.E; R.B. Perce and J.J. Mock. (1977). Leaf orientation and yield of maize. *Crop Sci.* 17: 883-886
- Perilli, S., Moubayidin, L., & Sabatini, S. (2010). The molecular basis of cytokinin function. *Current opinion in plant biology*, 13(1), 21-26.
- Porter, J. R., Xie, L., Challinor, A. J., Cochrane, K., Howden, S. M., Iqbal, M. M., ... &Travasso, M. I. (2014). Chapter 7: Food security and food production systems. Cambridge University Press.

- Potters, G., T.P. Pasternak, Y. Guisez, K.J. Palme y M.A.K. Jansen. (2007). Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble? *Trends Plant Sci.* 12(3), 99-105.
- Qin, H., Gu, Q., Zhang, J., Sun, L., Kuppu, S., Zhang, Y., Burow, M., Payton, P., Blumwald, E., Zhang, H., (2011). Regulated expression of an isopentenyltransferase gene (IPT) in peanut significantly improves drought tolerance and increases yield under field conditions. *Plant Cell Physiol.* 52,1904–1914.
- Quirino, B. F., Normanly, J., & Amasino, R. M. (1999). Diverse range of gene activity during *Arabidopsis thaliana* leaf senescence includes pathogen-independent induction of defense-related genes. *Plant molecular biology*, 40(2), 267-278.
- Rebetzke, G. J., Condon, A. G., Farquhar, G. D., Appels, R., & Richards, R. A. (2008). Quantitative trait loci for carbon isotope discrimination are repeatable across environments and wheat mapping populations. *Theoretical and Applied Genetics*, 118(1), 123-137.
- Reynolds, M. P., Pellegrineschi, A., & Skovmand, B. (2005). Sink-limitation to yield and biomass: a summary of some investigations in spring wheat. *Annals of Applied Biology*, 146(1), 39-49.
- Reynolds, M., Foulkes, M. J., Slafer, G. A., Berry, P., Parry, M. A., Snape, J. W., & Angus, W. J. (2009). Raising yield potential in wheat. *Journal of Experimental Botany*, 60(7), 1899-1918.
- Reynolds, M., Foulkes, J., Furbank, R., Griffiths, S., King, J., Murchie, E., ... & Slafer, G. (2012). Achieving yield gains in wheat. *Plant, Cell & Environment*, 35(10), 1799-1823.
- Richards R. A. (1991) Crop improvement for temperate Australia: future opportunities. *Field Crop Res* 26:141–169
- Richards, R. A. (2006). Physiological traits used in the breeding of new cultivars for water-scarce environments. *Agricultural water management*, 80(1), 197-211.
- Richards, T. A., Soanes, D. M., Jones, M. D., Vasieva, O., Leonard, G., Paszkiewicz, K., ... & Talbot, N. J. (2011). Horizontal gene transfer facilitated the evolution of plant parasitic mechanisms in the oomycetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(37), 15258-15263.
- Richards, C. L., Bossdorf, O., & Pigliucci, M. (2010). What role does heritable epigenetic variation play in phenotypic evolution?. *BioScience*, 60(3), 232-237.
- Riddle, N. C., E.J. Richards. (2002). The control of natural variation in cytosine methylation in *Arabidopsis*. *Genetics* 162: 355-363.
- Rivero, R. M., Kojima, M., Gepstein, A., Sakakibara, H., Mittler, R., Gepstein, S., & Blumwald, E. (2007). Delayed leaf senescence induces extreme drought tolerance in a flowering plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(49), 19631-19636.

- Rivero, R.M., Shulaev, V., Blumwald, E., (2009). Cytokinin-dependent photorespiration and the protection of photosynthesis during water deficit. *Plant Physiol.* 150, 1530–1540.
- Ruuska, S. A., Rebetzke, G. J., van Herwaarden, A. F., Richards, R. A., Fettell, N. A., Tabe, L., & Jenkins, C. L. (2006). Genotypic variation in water-soluble carbohydrate accumulation in wheat. *Functional Plant Biology*, 33(9), 799-809.
- Robertson, D., Zhang, H., Palta, J. A., Colmer, T., & Turner, N. C. (2009). Waterlogging affects the growth, development of tillers, and yield of wheat through a severe, but transient, N deficiency. *Crop and Pasture Science*, 60(6), 578-586.
- Roitsch, T., & Ehneß, R. (2000). Regulation of source/sink relations by cytokinins. *Plant Growth Regulation*, 32(2-3), 359-367.
- Sakakibara, H. (2006). Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57, 431-449.
- Sanchez-Garcia, M., Royo, C., Aparicio, N., Martin-Sanchez, J. A., & Alvaro, F. (2013). Genetic improvement of bread wheat yield and associated traits in Spain during the 20th century. *The Journal of Agricultural Science*, 151(1), 105-118.
- Sani, E., Herzyk, P., Perrella, G., Colot, V., & Amtmann, A. (2013). Hyperosmotic priming of *Arabidopsis* seedlings establishes a long-term somatic memory accompanied by specific changes of the epigenome. *Genome biology*, 14(6), R59.
- Sadras, V. O., & Rodriguez, D. (2007). The limit to wheat water-use efficiency in eastern Australia. II. Influence of rainfall patterns. *Australian Journal of Agricultural Research*, 58(7), 657-669.
- Sadras, V. O., & Denison, R. F. (2009). Do plant parts compete for resources? An evolutionary viewpoint. *New Phytologist*, 183(3), 565-574.
- Sadras, V. O., & Lawson, C. (2011). Genetic gain in yield and associated changes in phenotype, trait plasticity and competitive ability of South Australian wheat varieties released between 1958 and 2007. *Crop and Pasture Science*, 62(7), 533-549.
- Sadras, V. O., & Slafer, G. A. (2012). Environmental modulation of yield components in cereals: heritabilities reveal a hierarchy of phenotypic plasticities. *Field Crops Research*, 127, 215-224.
- Salehin, M., Bagchi, R., & Estelle, M. (2015). SCFTIR1/AFB-based auxin perception: mechanism and role in plant growth and development. *The Plant Cell*, 27(1), 9-19.
- Savin, R., & Slafer, G. A. (1991). Shading effects on the yield of an Argentinian wheat cultivar. *The Journal of Agricultural Science*, 116(1), 1-7.



- Schoppach, R., Taylor, J. D., Majerus, E., Claverie, E., Baumann, U., Suchecki, R., ... & Sadok, W. (2016). High resolution mapping of traits related to whole-plant transpiration under increasing evaporative demand in wheat. *Journal of experimental botany*, 67(9), 2847-2860.
- Schoppach, R., Fleury, D., Sinclair, T. R., & Sadok, W. (2017). Transpiration sensitivity to evaporative demand across 120 years of breeding of Australian wheat cultivars. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 203(3), 219-226.
- Serrago, R. A., Carretero, R., Bancal, M. O., & Miralles, D. J. (2011). Grain weight response to foliar diseases control in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Field Crops Research*, 120(3), 352-359.
- Setter, T. L., Burgess, P., Waters, I., & Kuo, J. (1999, September). Genetic diversity of barley and wheat for waterlogging tolerance in Western Australia. In *Proceedings of the 9th Australian Barley Technical Symposium* (pp. 1-7). Australian Barley Technical Symposium Inc.
- Shao H B, Chu LY, Lu ZH, Kang CM (2008). Primary antioxidant free radical scavenging and redox signaling pathways in higher plant cells. *Int. J. Biol. Sci.* 4: 8-14. Zhao H, Zhang ZB, Shao HB
- Sharif, R., & Dale, J. E. (1980). Growth-regulating substances and the growth of tiller buds in barley; effects of cytokinins. *Journal of Experimental Botany*, 31(4), 921-930.
- Shaw, RE; WS Meyer; A McNeill & SD Tyerman (2013). Waterlogging in Australian agricultural landscapes: a review of plant responses and crop models. *Crop Pasture Sci.* 64: 549-562.
- Shearman, V. J., Sylvester-Bradley, R., Scott, R. K., & Foulkes, M. J. (2005). Physiological processes associated with wheat yield progress in the UK. *Crop Science*, 45(1), 175-185.
- Shewry, P. R., Hawkesford, M. J., Piironen, V., Lampi, A. M., Gebruers, K., Boros, D., ... & Ward, J. L. (2013). Natural variation in grain composition of wheat and related cereals. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(35), 8295-8303.
- Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Seki, M. (2003). Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Current opinion in plant biology*, 6(5), 410-417.
- Simmons, S. R., & Jones, R. J. (1985). Contributions of pre-silking assimilate to grain yield in maize. *Crop Science*, 25(6), 1004-1006.
- Sinclair, T. R., & Horie, T. (1989). Leaf nitrogen, photosynthesis, and crop radiation use efficiency: a review. *Crop science*, 29(1), 90-98.
- Sivamani, E., Bahieldin, A., Wraith, J. M., Al-Niemi, T., Dyer, W. E., Ho, T. H. D., & Qu, R. (2000). Improved biomass productivity and water use efficiency under water deficit conditions in transgenic wheat constitutively expressing the barley HVA1 gene. *Plant science*, 155(1), 1-9.

- Slafer, G. A., & Andrade, F. H. (1991). Changes in physiological attributes of the dry matter economy of bread wheat (*Triticum aestivum*) through genetic improvement of grain yield potential at different regions of the world. *Euphytica*, 58(1), 37-49.
- Slafer, G. A., & Andrade, F. H. (1993). Physiological attributes related to the generation of grain yield in bread wheat cultivars released at different eras. *Field Crops Research*, 31(3-4), 351-367.
- Slafer, G. A., & Savin, R. (1994). Postanthesis green area duration in a semidwarf and a standard-height wheat cultivar as affected by sink strength. *Australian Journal of Agricultural Research*, 45(7), 1337-1346.
- Slafer, G. A. (2003). Genetic basis of yield as viewed from a crop physiologist's perspective. *Annals of Applied Biology*, 142(2), 117-128.
- Slafer, G. A., Miralles, D., Savin, R., Whitechurch, E. M., & González, F. G. (2003). Ciclo ontogénico, dinámica del desarrollo y generación del rendimiento y la calidad en trigo. *Producción de granos. Bases funcionales para su manejo*. Facultad de Agronomía Buenos Aires (ed), Argentina, 118-129.
- Slafer, G.A. (2003) Genetic basis of yield as viewed from a crop physiologist's perspective. *Ann. appl. Biol.* 142, 117-128
- Slaughter, A., Daniel, X., Flors, V., Luna, E., Hohn, B., & Mauch-Mani, B. (2012). Descendants of primed *Arabidopsis* plants exhibit resistance to biotic stress. *Plant physiology*, 158(2), 835-843.
- Slotkin, R. K., & Martienssen, R. (2007). Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nature Reviews Genetics*, 8(4), 272-285.
- Smart, C. M. (1994). Gene expression during leaf senescence. *New Phytologist*, 126(3), 419-448.
- Sparks CA. and Jones HD. (2004) Transformation of wheat by biolistics. In: (Curtis I, ed) *Transgenic Crops of the World*. Kluwer Academic Publ., pp 1-16.
- Stocker, T. (Ed.). (2014). *Climate change 2013: the physical science basis: Working Group I contribution to the Fifth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press.
- Suge, H., & Iwamura, H. (1993). Effect of cytokinin and anticytokinin on the tillering of barley. *Japanese Journal of Crop Science*, 62(4), 595-600.
- Sung, S., & Amasino, R. M. (2004). Vernalization and epigenetics: how plants remember winter. *Current opinion in plant biology*, 7(1), 4-10.
- Sýkorová, B., Kurešová, G., Daskalova, S., Trčková, M., Hoyerová, K., Raimanová, I.,... & Kamínek, M. (2008). Senescence-induced ectopic expression of the *A. tumefaciens* ipt gene in wheat delays leaf senescence, increases cytokinin content, nitrate influx, and nitrate reductase activity, but does not affect grain yield. *Journal of Experimental Botany*, 59(2), 377-387.

- Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M., & Murphy, A. (2015). *Plant physiology and development*. Sinauer Associates, Incorporated.
- Takumi, S., & Shimada, T. (1996). Production of transgenic wheat through particle bombardment of scutellar tissues: frequency is influenced by culture duration. *Journal of Plant Physiology*, 149(3-4), 418-423.
- Tamas, I. A. (1995). Hormonal regulation of apical dominance. In *Plant hormones* (pp. 572-597). Springer, Dordrecht.
- Tardieu, F., & Simonneau, T. (1998). Variability among species of stomatal control under fluctuating soil water status and evaporative demand: modelling isohydric and anisohydric behaviours. *Journal of experimental botany*, 419-432.
- Tardif, G., Kane, N.A., Adam, H., Labrie, L., Major, G., Gulick, P., Sarhan, F. and Laliberte, J.F. (2007) Interaction network of proteins associated with abiotic stress response and development in wheat. *Plant Mol. Biol.* 63, 703–718
- Thomas, H., Ougham, H. J., Wagstaff, C., & Stead, A. D. (2003). Defining senescence and death. *Journal of Experimental Botany*, 54(385), 1127-1132.
- Thorne, G. N. (1965). Photosynthesis of ears and flag leaves of wheat and barley. *Annals of Botany*, 29(3), 317-329.
- Tereshonok, D. V., Stepanova, A. Y., Dolgikh, Y. I., Osipova, E. S., Belyaev, D. V., Kudoyarova, G. R., & Vartapetian, B. B. (2011). Effect of the ipt gene expression on wheat tolerance to root flooding. *Russian journal of plant physiology*, 58(5), 799-807.
- Tester, M., & Langridge, P. (2010). Breeding technologies to increase crop production in a changing world. *Science*, 327(5967), 818-822.
- Trápani, N., Hall, A. J., Sadras, V. O., & Vilella, F. (1992). Ontogenetic changes in radiation use efficiency of sunflower (*Helianthus annuus* L.) crops. *Field Crops Research*, 29(4), 301-316.
- Uhart, S. A., Echeverría, H. E., & Frugone, M. L. (1998). Requerimientos nutricionales: Diagnóstico de la fertilización en los cultivos de girasol. *Morgan Semillas, Buenos Aires (Argentina)*, 29 pp.
- Ugarte, C., Calderini, D. F., & Slafer, G. A. (2007). Grain weight and grain number responsiveness to pre-anthesis temperature in wheat, barley and triticale. *Field Crops Research*, 100(2), 240-248.
- Van Herwaarden, A. F., Farquhar, G. D., Angus, J. F., Richards, R. A., & Howe, G. N. (1998). 'Haying-off', the negative grain yield response of dryland wheat to nitrogen fertiliser. I. Biomass, grain yield, and water use. *Australian Journal of Agricultural Research*, 49(7), 1067-1082.

- Van der Krol, A. R., Mur, L. A., Beld, M., Mol, J. N., & Stuitje, A. R. (1990). Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *The Plant Cell*, 2(4), 291-299.
- Vanyushin, B. (2006). DNA methylation in plants. *DNA methylation: basic mechanisms*, 67-122.
- Vasil, V., W.R.J. Marcotte, L. Rosenkrans, S.M. Cocciolone e I.K. Vasil. (1995). Overlap of viviparous1 (VP1) and abscisic acid response elements in the Em promoter: G-box elements are sufficient but not necessary for VP1 transactivation. *Plant Cell* 7, 1511-1518
- Vasil, V., Castillo, A. M., Fromm, M. E., & Vasil, I. K. (1992). Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus. *Bio/technology*, 10(6), 667.
- Verhoeven, K. J., Van Dijk, P. J., & Biere, A. (2010). Changes in genomic methylation patterns during the formation of triploid asexual dandelion lineages. *Molecular Ecology*, 19(2), 315-324.
- Verma, V., Foulkes, M. J., Worland, A. J., Sylvester-Bradley, R., Caligari, P. D. S., & Snape, J. W. (2004). Mapping quantitative trait loci for flag leaf senescence as a yield determinant in winter wheat under optimal and drought-stressed environments. *Euphytica*, 135(3), 255-263.
- Veselov, D., Kudoyarova, G., Symonyan, M., & Veselov, S. (2003). Effect of cadmium on ion uptake, transpiration and cytokinin content in wheat seedlings. *Bulg J PlantPhysiol*, 29(3-4), 353-359.
- Viglizzo, E. F., Jobbágy, E. G., Carreño, L., Frank, F. C., Aragón, R., De Oro, L., & Salvador, V. (2009). Dynamics of cultivation and floods in arable lands of Central Argentina. *Hydrology and earth system sciences*, 13, 2009.
- Vinocur, B., & Altman, A. (2005). Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Current opinion in biotechnology*, 16(2), 123-132.
- Yavas, I., Unay, A., & Aydin, M. (2012). The waterlogging tolerance of wheat varieties in western of Turkey. *The Scientific World Journal*, 2012.
- Wang, X., A. Elling, X. Li, N. Li, Z. Peng, G. He, H. Sun, Y. Qi, X. Liu, X. Deng. (2009). Genome-wide and organspecific landscapes of epigenetic modifications and their relationships to mRNA and small RNA transcriptomes in maize. *Plant Cell* 21: 1053-69.
- Wagner, E., Zenke, M., Cotten, M., Beug, H., & Birnstiel, M. L. (1990). Transferrin-polycation conjugates as carriers for DNA uptake into cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(9), 3410-3414.
- Walling, L. L. (2008). Avoiding effective defenses: strategies employed by phloem-feeding insects. *Plant Physiology*, 146(3), 859-866.

- Wang, K. C., & Chang, H. Y. (2011). Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. *Molecular cell*, 43(6), 904-914.
- Wang, X., Zhang, X., Chen, J., Wang, X., Cai, J., Zhou, Q., ... & Jiang, D. (2018). Parental drought-priming enhances tolerance to post-anthesis drought in offspring of wheat. *Frontiers in plant science*, 9, 261.
- Weeks, J. T., Anderson, O. D., & Blechl, A. E. (1993). Rapid production of multiple independent lines of fertile transgenic wheat (*Triticum aestivum*). *Plant Physiology*, 102(4), 1077-1084.
- Wendel, J. F., & Wessler, S. R. (2000). Retrotransposon-mediated genome evolution on a local ecological scale. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(12), 6250-6252.
- Westgate, M. E., Passioura, J. B., & Munns, R. (1996). Water status and ABA content of floral organs in drought-stressed wheat. *Functional Plant Biology*, 23(6), 763-772.
- Wang, X., Cai, J., Liu, F., Dai, T., Cao, W., Wollenweber, B., & Jiang, D. (2014). Multiple heat priming enhances thermo-tolerance to a later high temperature stress via improving subcellular antioxidant activities in wheat seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, 74, 185-192.
- Wang, X., Zhang, X., Chen, J., Wang, X., Cai, J., Zhou, Q., ... & Jiang, D. (2018). Parental drought-priming enhances tolerance to post-anthesis drought in offspring of wheat. *Frontiers in plant science*, 9, 261.
- Whitelaw, N. C., & Whitelaw, E. (2006). How lifetimes shape epigenotype within and across generations. *Human molecular genetics*, 15(suppl\_2), R131-R137.
- Whittle, C. A., Otto, S. P., Johnston, M. O., & Krochko, J. E. (2009). Adaptive epigenetic memory of ancestral temperature regime in *Arabidopsis thaliana*. This paper is one of a selection of papers published in a Special Issue from the National Research Council of Canada-Plant Biotechnology Institute. *Botany*, 87(6), 650-657.
- Winkel, T., Renno, J. F., & Payne, W. A. (1997). Effect of the timing of water deficit on growth, phenology and yield of pearl millet (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) Grown in Sahelian conditions. *Journal of Experimental Botany*, 48(5), 1001-1009.
- Wopereis, M. C. S., Kropff, M. J., Maligaya, A. R., & Tuong, T. P. (1996). Drought-stress responses of two lowland rice cultivars to soil water status. *Field Crops Research*, 46(1), 21-39.
- Wulff, R. D., Causin, H. F., Benitez, O., & Bacalini, P. A. (1999). Intraspecific variability and maternal effects in the response to nutrient addition in *Chenopodium album*. *Canadian Journal of Botany*, 77(8), 1150-1158.
- Xiao, L. P., Shi, Z. J., Xu, F., & Sun, R. C. (2012). Hydrothermal carbonization of lignocellulosic biomass. *Bioresource technology*, 118, 619-623.

- Xu, Y. F., Gendron, T. F., Zhang, Y. J., Lin, W. L., D'Alton, S., Sheng, H., ... & Rademakers, R. (2010). Wild-type human TDP-43 expression causes TDP-43 phosphorylation, mitochondrial aggregation, motor deficits, and early mortality in transgenic mice. *Journal of Neuroscience*, 30(32), 10851-10859.
- Xue, G. P., Way, H. M., Richardson, T., Drenth, J., Joyce, P. A., & McIntyre, C. L. (2011). Overexpression of TaNAC69 leads to enhanced transcript levels of stress up-regulated genes and dehydration tolerance in bread wheat. *Molecular Plant*, 4(4), 697-712.
- Yamamuro, C., Zhu, J. K., & Yang, Z. (2016). Epigenetic modifications and plant hormone action. *Molecular plant*, 9(1), 57-70.
- Yemm, E. W., & Willis, A. J. (1954). The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochemical journal*, 57(3), 508.
- Yoshida, S. (2003). Molecular regulation of leaf senescence. *Current opinion in plant biology*, 6(1), 79-84.
- Zhang, M. Y., Zheng, C. Y., Zou, M. M., Zhu, J. W., Zhang, Y., Wang, J., ... & Ma, Q. H. (2014). Lamotrigine attenuates deficits in synaptic plasticity and accumulation of amyloid plaques in APP/PS1 transgenic mice. *Neurobiology of aging*, 35(12), 2713-2725.
- Zahir, Z. A., Asghar, H. N., & Arshad, M. (2001). Cytokinin and its precursors for improving growth and yield of rice. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(3), 405-408.
- Zheng, M., Tao, Y., Hussain, S., Jiang, Q., Peng, S., Huang, J., ... & Nie, L. (2016). Seed priming in dry direct-seeded rice: consequences for emergence, seedling growth and associated metabolic events under drought stress. *Plant growth regulation*, 78(2), 167-178.
- Zhong, L., Xu, Y. H., & Wang, J. B. (2009). DNA-methylation changes induced by salt stress in wheat *Triticum aestivum*. *African Journal of Biotechnology*, 8(22).
- Zhou, H., Arrowsmith, J. W., Fromm, M. E., Hironaka, C. M., Taylor, M. L., Rodriguez, D., ... & Fry, J. E. (1995). Glyphosate-tolerant CP4 and GOX genes as a selectable marker in wheat transformation. *Plant Cell Reports*, 15(3-4), 159-163.
- Zhu, X.-G. Gsp Lon, DR Ort (2010). Improved photosynthetic efficiency higher performance. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 61, pp. 235-261
- Zhu, X., Sun, L., Kuppu, S., Hu, R., Mishra, N., Smith, J., ... & Shen, G. (2018). The yield difference between wild-type cotton and transgenic cotton that expresses IPT depends on when water-deficit stress is applied. *Scientific reports*, 8(1), 2538.